

Письмо редакторов

Уважаемые читатели «Acta Naturae»! Вашему вниманию предлагается 12-й номер нашего журнала – первый в 2012 г. Как видите, вопреки мнению скептиков, наш журнал жив, портфель редакции полон, и мы смотрим на будущее с осторожным оптимизмом. Проблемы, конечно, остаются, и главная из них на сегодняшний день – наконец-то занять положенное нам место в PubMed. К сожалению, история эта все еще тянется, причем не по нашей вине. Приходится преодолевать много трудностей, прежде всего постоянное изменение требований, которые нам предъявляются. Но, похоже, наша борьба вступила, наконец, в завершающую фазу, и мы надеемся, что наступивший високосный год будет для журнала счастливым в этом и других отношениях.

Но вернемся, однако, к текущему номеру. Раздел «Форум» открывается очерком, посвященным жизни и деятельности академика Александра Евсеевича Браунштейна, 110-летие со дня рождения которого мы отмечаем в этом году. Все, кому посчастливилось знать Александра Евсеевича, хранят в памяти образ этого замечательного человека и крупнейшего ученого, одного из наиболее ярких представителей биохимии XX века. Очерк написан ученицей Александра Евсеевича проф. Т.В. Демидкиной, возглавляющей созданную им лабораторию в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта. Второй материал «Форума» – интервью с В.А. Рихтером, в котором он делится своими соображениями о продвижении инновационных биомедицинских разработок и роли го-

сударства в этом процессе. Надеемся, что материалы «Форума» будут интересны самому широкому кругу читателей.

Научная часть журнала открывается двумя обзорами, посвященными актуальным задачам клеточной биологии, – исследованиям индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (И.А. Мучкаева и др.) и регуляции иммунитета мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (Ю.П. Рубцов и др.). Отрадно, что авторы обоих обзоров большое внимание уделяют медицинским приложениям рассматриваемых ими проблем, что значительно повышает интерес к ним. Как и всегда, биомедицинская тематика занимает значительную часть данного номера – см. статьи Н.А. Орловой, Л.З. Вельшера и др., М.А. Володиной и др.

Ряд сообщений посвящен различным аспектам молекулярной генетики, зачастую также связанным с медициной (работы С.А. Боринской и др., Е.А. Трифионовой и др., Г.А. Степанова и др.). Наконец, имеются сообщения, связанные с технологиями получения и тестирования биомолекул и клеток, в том числе с измененными свойствами (работы Е.М. Смекаловой и др., Е.С. Колотовой и др., О.Н. Солоповой и др., О.В. Бондарь и др.).

Как видно, представленные работы весьма разнообразны как по тематикам, так и использованным методам. Однако их объединяет нечто общее – все они выполнены на современном уровне, что, собственно, и позволяет нам смотреть с оптимизмом на будущее нашего с вами журнала. ●

До новых встреч!

Наука и технологии России – STRF.ru



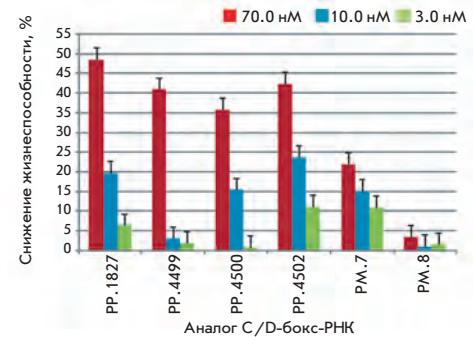
- 40% учёных согласны с тем, что публикации о результатах научной работы способствуют просвещению общества, росту престижа профессии учёного, улучшению имиджа науки
- 34% считают, что, распространяя информацию о результатах своей работы, они смогут привлечь клиентов, партнёров, деньги
- 12% надеются,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

Аналоги малых ядрышковых С/D-бок-РНК человека как регуляторы альтернативного сплайсинга пре-мРНК-мишени

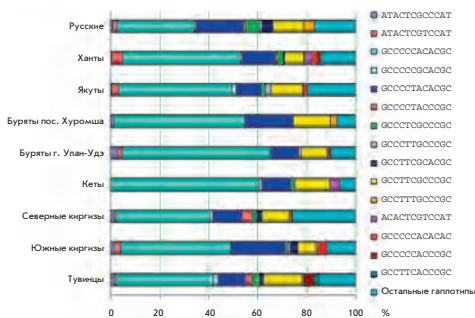
Г. А. Степанов, Д. В. Семенов, Е. В. Кулигина, О. А. Коваль, И. В. Рабинов, Ю. Я. Кит, В. А. Рихтер

Сконструированы и синтезированы искусственные аналоги U24 С/D-бок-мяоРНК, направленные на нуклеотиды 28S и 18S рРНК человека, пре-мРНК и зрелой мРНК белка теплового шока hsc70. Трансфекция клеток человека синтетическими аналогами С/D-бок-РНК, несущих область узнавания, комплементарную пре-мРНК белка hsc70, вызывает частичное нарушение сплайсинга мРНК-мишени. Трансфекция аналогами С/D-бок-РНК, направленными на нуклеотиды 18S и 28S рРНК, ключевых для функционирования рибосом, приводит к снижению жизнеспособности клеток MCF-7.



Влияние синтетических аналогов С/D-бок-РНК на жизнеспособность клеток MCF-7.

Генетическое разнообразие и структура неравновесия по сцеплению гена MTHFR в популяциях Северной Евразии



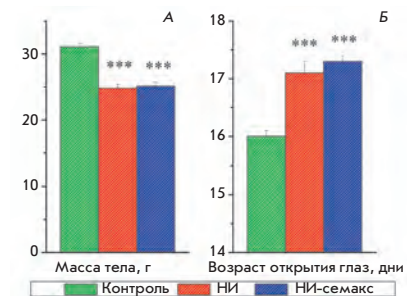
Распределение гаплотипов в изученных популяциях.

Е. А. Трифонова, Е. Р. Еремина, Ф. Д. Урнов, В. А. Степанов
Исследована структура гаплотипов и неравновесия по сцеплению (LD) в локусе метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) в девяти этнотерриториальных выборках Северной Евразии и популяциях из международного проекта НарМар. Полученные данные свидетельствуют о том, что архитектура LD в геноме человека в значительной степени определяется эволюционной историей популяций, тем не менее, результаты гаплотипического и филогенетического анализа указывают на возможность существования общего, «древнего» механизма формирования некоторых паттернов LD.

Коррекция семаксом долговременных негативных эффектов неонатальной изоляции у белых крыс

М. А. Володина, Е. А. Себенцова, Н. Ю. Глазова, Д. М. Манченко, Л. С. Иноземцева, О. В. Долотов, Л.А. Андреева, Н. Г. Левицкая, А. А. Каменский, Н. Ф. Мясоедов

Неблагоприятные воздействия в период раннего неонатального развития вызывают негативные изменения физиологических и нейробиологических функций и приводят к долговременным нарушениям поведения животных. Изучены отставленные эффекты хронического неонатального стресса у белых крыс и оценена возможность их коррекции последующим введением аналога фрагмента АКТГ(4–10) препарата семакс. Показано, что неонатальная изоляция (НИ) приводит к замедлению физического развития животных, нарушению метаболических процессов и ослаблению гормонального ответа на острый стресс. Введение семакса крысам, подвергавшимся неонатальной изоляции, ослабляло влияние изоляции на массу тела животных, уменьшало метаболические нарушения и приводило к увеличению вызванного стрессом выброса кортикостерона до контрольных значений.



Влияние неонатальной изоляции на массу тела крыс в возрасте 15 дней (А) и время открытия глаз (Б).

Acta Naturae

ТОМ 4, № 1 (12), ЯНВАРЬ—МАРТ 2012

Учредители:

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

Редакционный совет:

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

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

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре
Издатель: А.И. Гордеев

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

Руководитель проекта: 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

Корректура: Р.С. Шаймарданова

Дизайн-проект: Х. Шнайдер

Адрес редакции: 119234, Москва, Ленинские горы,

Научный парк МГУ, владение 1, строение 75Г.

Телефон/факс: +7 (495) 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 марта 2012 г.

Тираж 300 экз. Цена свободная.

Отпечатано в типографии «МЕДИА-ГРАНД»

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

СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов 1

ФОРУМ

Т. В. Демидкина

К 110-летию со дня рождения академика Александра Евсеевича Браунштейна 6

В.А. Рихтер: «Преимущество препарата — низкая токсичность и оригинальность...» 9

ОБЗОРЫ

И. А. Мучкаева, Э. Б. Дашинимаев,
В. В. Терских, Ю. В. Суханов, А. В. Васильев

Молекулярные механизмы индуцированной плюрипотентности 12

Ю. П. Рубцов, Ю. Г. Суздальцева, К. В. Горюнов,
Н. И. Калинина, В. Ю. Сысоева, В. А. Ткачук

Регуляция иммунитета мультипотентными мезенхимными стромальными клетками 24

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Г. А. Степанов, Д. В. Семенов, Е. В. Кулигина,
О. А. Коваль, И. В. Рабинов, Ю. Я. Кит,
В. А. Рихтер

Аналоги малых ядершковых С/D-боксов-РНК человека как регуляторы альтернативного сплайсинга пре-mРНК-мишени 34

С. А. Боринская, Ж. М. Кожекбаева,
А. В. Залесов, Е. В. Ользеева, А. Р. Максимов,
С. И. Куцев, М. М. Гараев, А. В. Рубанович,
Н. К. Янковский

**Снижение риска инфицирования
ВИЧ и летальности у гетерозигот
по делеционному аллелю *CCR5del32*
гена хемокинового рецептора: исследо-
вание случая фокусной нозокомиальной
ВИЧ-инфекции и мета-анализ** 44

Е. А. Трифонова, Е. Р. Еремина, Ф. Д. Урнов,
В. А. Степанов

**Генетическое разнообразие и структура
неравновесия по сцеплению гена *MTHFR*
в популяциях Северной Евразии** 55

Е. М. Смекалова, О. А. Петрова, М. Э. Зверева,
О. А. Донцова

**Рекомбинантная форма *TERT*
Hansenula polymorpha обладает
ограниченной обратотранскриптазной
активностью** 72

О. Н. Солопова, Л. П. Позднякова,
Н. Е. Варламов, М. Н. Боков, Е. В. Морозкина,
Т. А. Ягудин, П. Г. Свешников

**Конформационные отличия активных
ангиотензинов от их неактивных
предшественников** 76

О. В. Бондарь, Д. В. Сайфуллина,
И. И. Мавлютова, Т. И. Абдуллин

**Мониторинг дзета-потенциала клеток
человека при снижении их жизнеспособ-
ности и взаимодействии с полимерами** . 80

Л. З. Вельшер, А. А. Космынин, М. Ю. Бяхов,
Т. К. Дудицкая, Д. Н. Решетов

**Таргетная терапия — новый подход
в лечении местно-распространенного
рака орофарингеальной зоны** 84

М. А. Володина, Е. А. Себенцова,
Н. Ю. Глазова, Д. М. Манченко,
Л. С. Иноземцева, О. В. Долотов,
Л. А. Андреева, Н. Г. Левицкая,
А. А. Каменский, Н. Ф. Мясоедов

**Коррекция семаксом долговременных
негативных эффектов неонатальной
изоляции у белых крыс** 88

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

**Стабильная экспрессия рекомбинантного
фактора свертывания крови VIII
в клетках СНО с использованием
амплификации трансгена,
инициированной метотрексатом** 96

Е. С. Колотова, С. Г. Егорова, А. А. Рамонова,
С. Э. Богородский, В. К. Попов, И. И. Агапов,
М. П. Кирпичников

**Цитотоксические и иммунохимические
свойства вискумина, инкапсулированного
в полилактидные микрочастицы** 105

Правила для авторов 111



РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Структура неравновесия по сцеплению в гене *MTHFR*
в исследованных популяциях.
(См. статью Трифоновой и др.)

К 110-летию со дня рождения академика Александра Евсеевича Браунштейна

Т. В. Демидкина

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

E-mail: tvd@eimb.ru

Будущий известный биохимик Александр Евсеевич Браунштейн родился 26 мая 1902 г. в семье потомственных врачей. Его отец был офтальмологом, профессором Харьковского медицинского института и президентом Харьковского медицинского общества.

В 1913 г. Александр Евсеевич поступил сразу в 3-й класс гимназии, а до этого получил разностороннее и основательное домашнее образование. Александр Евсеевич свободно владел немецким, английским и французским языками, что, как отмечал он сам, во многом помогало ему как в научной работе, так и служило источником дополнительных заработков. Склонность к науке у Александра Евсеевича проявилась рано. Еще в детстве он увлекался химией и имел дома небольшую химическую лабораторию. После окончания гимназии в 1920 г. он поступил в Харьковский государственный медицинский институт, поскольку в то время это было единственным местом на Украине, где можно было получить высшее образование в области естественных наук.

Научная деятельность А.Е. Браунштейна началась в 1925 г. в составе первого набора аспирантуры Института биохимии Наркомздрава в Москве под руководством В.А. Энгельгардта. И уже в 1928 г. А.Е. Браунштейн защитил канди-

датскую диссертацию, посвященную взаимоотношениям гликолиза и обмена фосфатов в красных кровяных тельцах. В 1928–1936 гг. Александр Евсеевич изучал окислительное и дыхательное фосфорилирование и детоксикацию ароматических соединений. В этом, как и в дальнейших исследованиях, прекрасное знание химии и трех иностранных языков помогало ему работать на современном уровне биохимии, которая в XX веке быстро развивалась и перешла от описания метаболических процессов к установлению их молекулярных механизмов.

В 1936 г. А.Е. Браунштейн стал руководителем лаборатории промежуточного азотистого обмена во Всесоюзном институте экспериментальной медицины им. А.М. Горького. Здесь в 1937 г. совместно с М.Г. Крицман он открыл новую ферментативную реакцию обратимого переноса аминокислоты от α -аминокислот к кетокислотам, названную «трансаминированием» [1]. Это открытие, одно из крупных в биохимии XX века, имело фундаментальное значение для понимания путей ассимиляции и диссимиляции азота. С этого времени научные интересы А.Е. Браунштейна практически полностью связаны с исследованием ферментативных реакций превращений аминокислот и выяснением роли реакции трансаминирования в об-

мене веществ. Эта работа была прервана Великой Отечественной войной и продолжена в 1945 г. в Институте биологической и медицинской химии АМН СССР.

Среди исследований, выполненных в это время, следует отметить экспериментальное подтверждение высказанной А.Е. Браунштейном в 1939 г. гипотезы о ключевой роли согласованного действия трансаминазы и глутаматдегидрогеназы в метаболизме азота и его сопряжения с энергетическими процессами в клетке [2]. После обнаружения в 1944–1945 гг. (в США и Великобритании) участия пиридоксаль-5'-фосфата (витамина B_6) в ферментативных реакциях трансаминирования и декарбоксилирования, в лаборатории А.Е. Браунштейна началось интенсивное изучение участия пиридоксаль-5'-фосфата в азотистом обмене. Были найдены неизвестные пиридоксаль-5'-фосфат-зависимые реакции превращений триптофана, серина, цистеина и их аналогов. В 1949 г. А.Е. Браунштейн опубликовал замечательную во многих отношениях статью о путях превращений *L*-триптофана у животных [3]. Во-первых, предложенные в этой работе метаболические реакции вскоре были полностью подтверждены экспериментально. Во-вторых, в этой статье была выдвинута гипотеза о том, что уча-



Александр Евсеевич Браунштейн

«На моем научном пути были ошибочные "открытия" и спорные выводы. Однако большинство наших наиболее важных результатов получили всеобщее признание как внесшие фундаментальный вклад в современное понимание путей метаболизма аминокислот и основ ферментативного катализа, а также в понимание взаимосвязи метаболизма азотистых и серосодержащих соединений.

Для ученого такое признание является самой высокой оценкой его труда».

стие пиридоксаль-5'-фосфата в известных к тому времени ферментативных превращениях аминокислот следует объяснять электронными свойствами молекулы кофермента, т.е. она содержала предпосылки общей теории пиридоксалевого катализа. В-третьих, был предложен механизм реакции расщепления *L*-кинуренина, отличный от двух механизмов, предложенных зарубежными учеными. В 1998 г. получены подтверждения правильности механизма, предложенного А.Е. Браунштейном [4]. Здесь еще раз нужно отметить, что все предположения и выводы, сделанные в работе, были бы невозможны без хорошего знания А.Е. Браунштейном органической химии.

Общая теория пиридоксаль-5'-фосфат-зависимого катализа была сформулирована А.Е. Браунштейном и М.М. Шемякиным в 1952–1953 гг. В ней рассматривались электронные особенности пиридоксаль-5'-фосфата, обеспечивающие его участие в катализе химических реакций различного типа и постулировалось участие белковой матрицы ферментов в обеспечении их реакционной специфичности [5]. Годом позже американские коллеги выдвинули аналогичную теорию [6]. Эти работы не только послужили основой для объяснения механизмов действия пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов, но и стимулировали исследования механизмов других кофермент-зависимых реакций.

В 1960 г. А.Е. Браунштейн был приглашен В.А. Энгельгардтом в только что созданный Институт радиационной и химической биологии АН СССР (позже – Институт молекулярной биологии АН СССР), где организовал лабораторию химических основ биокатализа. В своей автобиографии (1981 г.) А.Е. Браунштейн писал: «С этой поры усилия на-

шего коллектива были сосредоточены преимущественно на исследовании с помощью комплекса новейших химических и физических подходов молекулярной структуры и детального каталитического механизма главных типов пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов». Созданный В.А. Энгельгардтом институт, объединивший ученых разных специальностей и интересов, обеспечил возможность проводить такие комплексные исследования, которые во многом способствовали развитию молекулярной энзимологии в нашей стране, а также формированию научного мировоззрения и высокой квалификации учеников и коллег А.Е. Браунштейна. В настоящее время ученики школы А.Е. Браунштейна – родоначальники отечественной молекулярной энзимологии – работают в самых разных областях физико-химической биологии.

Среди наиболее значимых работ А.Е. Браунштейна и его сотрудников следует упомянуть динамическую молекулярную модель ферментативного трансаминирования, созданную в 1968 г. [7], определение в 1972 г. (совместно с Ю.А. Овчинниковым и сотрудниками Института биоорганической химии) аминокислотной последовательности

аспартат-аминотрансферазы из цитозоля сердца свиньи [8], установление пространственной структуры аспартат-аминотрансферазы из цитозоля сердца курицы (1977 г.) совместно с Б.К. Вайнштейном и сотрудниками Института кристаллографии им. В.А. Шубникова [9]. Главные итоги своих разносторонних научных исследований А.Е. Браунштейн объединил в книге [10], вышедшей уже после его ухода из жизни 1 июля 1986 г.

Немалую роль в замечательно успешную и плодотворную научную работу А.Е. Браунштейна внесла его женитьба (в 1936 г.) на Софье Вильгельмовне Крейден – с тех пор, как писал А.Е. Браунштейн, «ее неотразимое обаяние и преданная забота поддерживают в нашем доме редкостную, стойкую атмосферу согласия и счастья». Все, кому довелось работать и общаться с Александром Евсеевичем, бывать у него дома, помнят не только его уникальную научную эрудицию, но и неизменные доброжелательность, приветливость и гостеприимство Софьи Вильгельмовны и Александра Евсеевича.

А.Е. Браунштейн много времени уделял научно-организационной работе. Он был членом редакционных коллегий многих отечественных и зарубежных журналов, научных советов, биохимических

обществ. Его энциклопедические знания во многом способствовали выработке принципов классификации ферментов и биохимической номенклатуры.

А.Е. Браунштейн и его работы получили широкое международное признание. Он пользовался высочайшим научным авторитетом в нашей стране и за рубежом. В лабораторию химических основ биокатализа приезжали с визитами и работали многие зарубежные ученые, в том числе Н. В. F. Dixon (Великобритания), Н.С. Dunathan и D.E. Metzler (США).

Влияние идей Александра Евсеевича на современную физико-химическую биологию и молекулярную энзимологию трудно переоценить. А.Е. Браунштейн был избран действительным членом Академии медицинских наук (1945 г.) и Академии наук СССР (1964 г.), почетным доктором Университетов Брюсселя, Грейсфальда, Парижа-VII и почетным членом научных обществ и академий наук ряда стран, в том числе Национальной академии наук США.

А.Е. Браунштейн был лауреатом Государственной (1941 г.) и Ленинской (1980 г.) премий в области науки и техники, он удостоен звания Героя Социалистического Труда (1972 г.), награжден двумя орденами Трудового Красного Знамени. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Браунштейн А.Е., Крицман М.Г. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1937. Т. 3. С. 246–248.
2. Braunstein A.E. // Adv. Enzymol. 1957. V. 19. P. 335–389.
3. Браунштейн А.Е. // Докл. АН СССР. 1949. Т. 65. С. 715–718.
4. Phillips R.S., Sundararaju B., Koushik S.V. // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 1376–1382.
5. Браунштейн А.Е., Шемякин М.М. // Биохимия. 1953. Т. 18. С. 393–411.
6. Metzler D.E., Ikawa M., Snell E.E. // J. Am. Chem. Soc. 1954. V. 76. P. 648–652.
7. Braunstein A.E., Ivanov V.I., Karpeisky M.Ya. Pyridoxal Catalysis: Enzymes and Model Systems. J. Wiley & Sons, Inc., 1968. 13 p.
8. Овчинников Ю.А., Браунштейн А.Е., Егоров Ц.А., Поляновский О.Л., Алданова Н.А., Фейгина М.Ю., Липкин В.М., Абдулаев Н.Г., Гришин Е.В., Киселев А.П. и др. // Докл. АН СССР. 1972. Т. 207. С. 728–731.
9. Борисов В.В., Борисова С.Н., Качалова Г.С., Сосфенов Н.И., Воронова А.А., Вайнштейн Б.К., Торчинский Ю.М., Волкова Г.А., Браунштейн А.Е. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 235. С. 212–215.
10. Браунштейн А.Е. Процессы и ферменты клеточного метаболизма. М.: Наука, 1987. 552 с.

В.А. Рихтер: «Преимущество препарата – низкая токсичность и оригинальность...»

Несомненно, для отечественных разработчиков новых препаратов необходима мощная финансовая поддержка со стороны государства. Другой вопрос, какова должна быть степень участия государства и в какой момент должны подключаться индустриальные инвесторы?



Владимир Александрович Рихтер

В ходе реализации начального этапа стратегии «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» можно говорить о первых активных инициативах государства по финансированию научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ в области создания новых лекарственных препаратов. А если точнее, то о результатах конкурсов на заключение государственных контрактов по ряду мероприятий, реализуемых в рамках данной ФЦП. Одна из задач – финансировать те разработки, которые будут выведены на рынок в достаточно короткий срок. Так, в текущем году Министерство образования и науки РФ объявило несколько лотов на проведение открытого конкурса на право заключения государственных контрактов на выполнение работ по доклиническим исследованиям перспективных инновационных разрабо-

ток лекарственных препаратов. Мы побеседовали с **Владимиром Александровичем Рихтером**, зам. директора по научной работе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, который стал победителем с проектом «Доклинические исследования лекарственного средства – противоопухолевого препарата на основе пептида из молока человека – лактаптина».

– Владимир Александрович, расскажите, пожалуйста, об инновационном препарате, доклинические исследования вы планируете провести?

– Многие годы основными способами лечения онкологических заболеваний были хирургия, химиотерапия и радиотерапия, направленные на удаление первичной опухоли. При этом главной причиной последующей смертности оставался метастатический рост опухолей. В основе новых онкотерапевтических соединений лежит принцип «направлен-

ного действия», то есть создание препаратов, подавляющих жизнеспособность клеток опухоли, но при этом не вызывающих гибели «нормальных» клеток.

Несколько лет назад мы обнаружили, что в человеческом молоке есть белковый фактор, который вызывает апоптоз, то есть запрограммированную гибель раковых клеток. Этот фактор мы очистили до гомогенного состояния и обнаружили, что он представляет из себя пептид, являющийся фрагментом каппа-казеина молока, состоящий из 74 аминокислотных остатков и имеющий молекулярную массу 8.6 кДа. Новый пептид мы назвали лактаптином (название отражает происхождение пептида и его апоптотические свойства).

Далее, с помощью методов генной инженерии мы получили ряд продуцентов различных аналогов этого пептида в *E. coli* и сравнили их воздействие на раковые клетки. Наиболее похожим по своим свойствам на природный пеп-

тид оказался аналог RL-2. Его мы и использовали для проверки эффективности на различных линиях клеток. Наиболее чувствительными к действию препарата оказались клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Поэтому все последующие эксперименты по выяснению механизма апоптотического действия RL-2 *in vitro* были проведены на этой линии клеток.

– Судя по тому, что вы вышли на доклинические испытания, препарат показал хорошие результаты на модельных животных?

Да. Мы обнаружили, что наш пептид вызывает апоптоз некоторых линий онкотрансформированных клеток мыши. Мы попытались разработать метод лечения злокачественных образований мышей и получили очень обнадеживающие результаты: при внутривенном введении RL-2 мышам с привитой опухолью происходит значительное торможение роста опухоли. Кроме того, терапия RL-2 значительно увеличивает продолжительность жизни мышей с асцитными опухолями. Мы сравнили действие нашего пептида с действием стандартного препарата циклофосфамида, традиционно применяемого для химиотерапии, и обнаружили, что препараты действуют примерно одинаково. Более того, вместе они дают синергический эффект, усиливая действие друг друга. Таким образом, мы установили, что наш пептид специфически действует на выбранную мишень

и, следовательно, может рассматриваться как потенциальный лекарственный противоопухолевый препарат.

– В чем же преимущество вашего препарата?

– Основными преимуществами нашего пептида можно считать низкую токсичность препарата и его оригинальность. В качестве основы претендента на лекарственное средство мы используем нетоксичный, неиммуногенный белок молока человека. Проведенные нами патентные исследования показали, что ранее никто не использовал протеолитические фрагменты каппа-казеина (в том числе и лактаптина) для терапии рака.

– О конкурентах: вы не боитесь, что фармгиганты вас опередят, ведь их ресурсы много больше ваших?

– Начнем с того, что в настоящее время на рынке крайне мало противоопухолевых препаратов пептидной или белковой природы. Вполне возможно, что кто-нибудь предпримет усилия и сможет нас опередить. Полной гарантии такого развития событий нет ни у кого. Даже наличие патентов не дает 100% защиты. Мы прекрасно понимаем, что самим нам будет очень трудно довести препарат до лекарственного средства даже при успешном завершении доклинических испытаний. На данном этапе нам остается лишь усиленно работать и надеяться на привлечение в партнеры крупной фармацевтической компании.

– Вы сами будете проводить испытания или планируете привлечь партнеров?

– Значительную часть работ будем делать сами. Поскольку регламент проведения доклинических испытаний подразумевает проведение некоторых работ организациями, имеющими соответствующие лицензии и разрешения, мы будем привлекать такие организации для выполнения отдельных этапов исследования.

– Работы по доклиническим испытаниям по данному госконтракту должны быть выполнены с привлечением внебюджетного финансирования?

– Наши партнеры – это малое коммерческое предприятие, которое давно участвует в этой разработке и вкладывает свои средства в реализацию проекта. В настоящее время именно это малое предприятие оборудует производственные площади для наработки опытных партий препарата.

– Сама экспертиза проекта была тяжелой?

– На стадии оформления технического задания мы вели длительную переписку с экспертом, который нас курировал. Сначала мы не очень хорошо понимали друг друга, поскольку мы ничего не понимали в специфических требованиях, предъявляемых к продуктам медицинского назначения, – ведь мы просто ученые. В результате мы приобрели неоценимый опыт и очень благодарны нашему эксперту за проявленную терпимость при подготовке нашего проекта. ●

Беседовала
Елена Новосёлова

Подписка на 2012 год Скидка 10%

+7 495 930-88-06

Подробности на сайте: www.actanaturae.ru

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

ПАРАМЕТРЫ СТЕЙКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Среди различных типов контактов в биомолекулярных комплексах (водородные связи, электростатические взаимодействия и др.) стейкинг ароматических фрагментов заслуживает особого внимания. Большинство лекарственных препаратов содержат ароматические циклы, и стейкинг часто играет важную роль в молекулярном узнавании рецептор-лиганд. Ранее мы показали [5], что явный учет стейкинг-взаимодействий существенно повышает эффективность модели АТФ. Стейкинг-контакты описывали функцией, зависящей от геометрических параметров взаимного расположения двух ароматических фрагментов – высоты h и угла α между осями d одного из колец относительно другого (рис. 1).

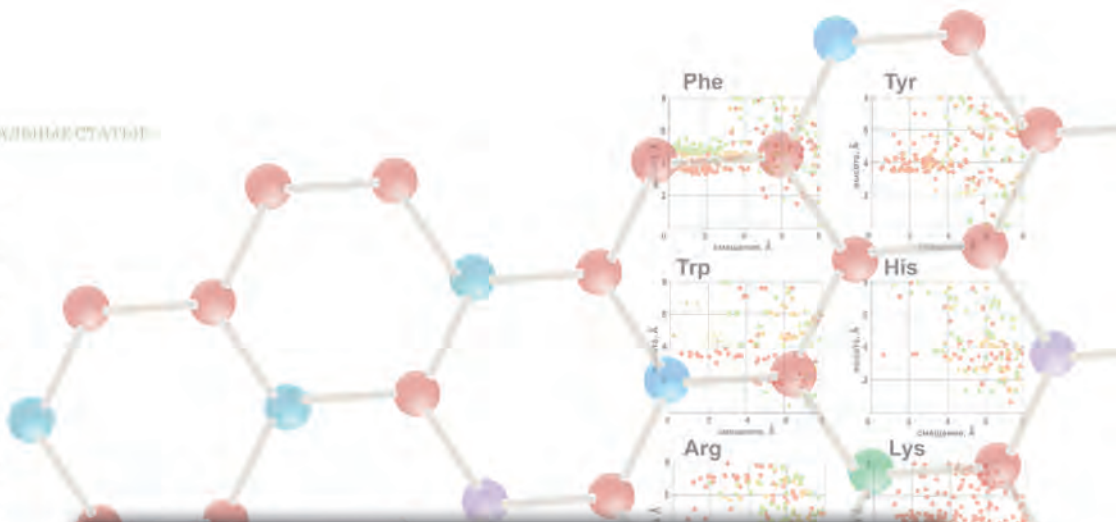
Диапазон этих параметров, определяющий наличие или отсутствие стейкинга, до сих пор остается не выясненным и в основных критериях выбора достаточно произвольно [6, 7]. Его уточнение могло бы повысить эффективность оценки качества и достоверности структур безводородных, предлагаемых методов молекулярного моделирования. С этой целью мы провели анализ экспериментально установленных пространственных структур атомного разрешения для комплексов различных белков с лигандами, содержащими наиболее распространенные пуриновые основания – аденин и гуанин.

Наивный пример стейкинг-взаимодействий – параллельное укладка водородных оснований нуклеотидов в ДНК [8, 9]. Но некоторые ароматические соединения стремятся расположиться не только параллельно, но еще и перпендикулярно друг другу, как это показано для аминокислот в белках [7, 10] и в модельных системах, состоящих из простых углеводородов – бензоид, нафталинд [11–14]. Кроме того, такие соединения имеют тенденцию участвовать в π -катионном взаимодействии, при котором образуется контакт между положительно заряженными группами и π -электронным облаком [15–17].

Поэтому мы исследовали распределение параметров h и α в зависимости от угла α относительно азотистого основания лиганда для ароматических боковых цепей остатков Phe, Trp, Tyr, и His, а также для полностью заряженных гуанидиновой группы Arg и аминогруппы Lys. На рис. 2 приведены результаты для лигандов, содержащих гуанин.

Показано, что для остатка Phe характерны два адитивных положения над плоскостью гуанинового коль-

Рис. 1. Геометрические параметры, с помощью которых описывают стейкинг-взаимодействие между двумя ароматическими кольцами. Символы (a) и высота (h) между осями d колец относительно друг друга; угол (α) между нормальными к плоскостям колец.



ActaNaturae

АПРЕЛЬ-ИЮНЬ 2009 № 1

НЕПРИРОДНЫЕ АНТИТЕЛА
ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

РЕГУЛЯЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗЫ В ОНКОГЕНЕЗЕ
СТР. 51

СТРУКТУРА МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ВОЗБУДИТЕЛЯ ОПИСТОРХОЗА
СТР. 99

СТЕЙКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В КОМПЛЕКСАХ БЕЛКОВ С АДЕНИН- И ГУАНИН-

УДК 577.21:576.364:615-085:576.367

Молекулярные механизмы индуцированной плюрипотентности

И. А. Мучкаева*, Э. Б. Дашинимаев, В. В. Терских, Ю. В. Суханов, А. В. Васильев
 Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26
 *E-mail: izomerizaciya@list.ru
 Поступила в редакцию 02.12.2011 г.

РЕФЕРАТ Обзор посвящен исследованиям в области репрограммирования соматических клеток. Рассмотрены молекулярные механизмы получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) с использованием лентивирусной трансфекции для введения в клетки транскрипционных факторов. Большое внимание уделено получению иПСК без генетических модификаций генома с помощью мРНК транскрипционных факторов и малых молекул. Обсуждается прямое репрограммирование соматических клеток, минуя стадию индукции плюрипотентности. Рассмотрены различия между эмбриональными стволовыми клетками и иПСК и проблема эпигенетической памяти. В заключении обсуждается возможность применения иПСК в регенеративной медицине.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА репрограммирование, эмбриональные стволовые клетки; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцировка, трансформация, плюрипотентность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; Chd1 (chromodomain helicase DNA binding protein) – ДНК-связывающий белок с геликазным хромодоменом; BAF (rg/Brahma-associated factor) – фактор транскрипции, ассоциированный с rg-Brahma; миРНК, miR – микроРНК; TERRA (telomeric-repeat-containing RNA) – РНК, содержащая теломерные повторы; Cdkn (cyclin-dependent kinase inhibitor) – ингибитор циклин-зависимых протеинкиназ; VPA – вальпроевая кислота, 2-пропилвалериановая кислота; siRNA (small interfering RNA) – малые интерферирующие РНК; KMOS – набор факторов транскрипции Klf4, c-Myc, Oct4, Sox2; KOS – набор факторов транскрипции Klf4, Oct4, Sox2; LNOS – набор факторов транскрипции – Lin28, Nanog, Oct4, Sox2; GSK-3 (glycogen synthase kinase 3) – киназа 3 гликогенсинтазы; АФК – активные формы кислорода; VEGF (vascular endothelial growth factor) – фактор роста сосудистого эндотелия.

ВВЕДЕНИЕ

Плюрипотентные стволовые клетки способны к самообновлению и к генерации всех клеточных типов трех зародышевых листков. До недавнего времени источником плюрипотентных стволовых клеток служили культуры, полученные из клеток внутренней массы бластоцисты: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) [1, 2]. Однако сам метод получения ЭСК был связан со многими практическими и этическими проблемами, которые исключали возможность клинического применения ЭСК. В связи с этим мировое научное сообщество продолжало заниматься активным поиском приемлемого метода получения клеток, подобных ЭСК по характеристикам. Определенные успехи были достигнуты в 1997 г., когда Wilmut и соавт. репрограммировали соматические клетки молочной железы, посредством переноса их ядер в ооциты второго деления мейоза (somatic cell nuclear transfer, SCNT) овцы [3–6]. В 2001 г. Tada и соавт. достигли подобного результата путем слияния тимоцитов мыши с ЭСК [7]. Однако техническую сложность и низкую

воспроизводимость этих методов устранить не удалось. Все попытки применения данных методик для клеток приматов оказались тщетными.

Основываясь на накопленных данных, исследователи Takahashi и Yamanaka в 2006 г. предположили, что неоплодотворенная яйцеклетка и ЭСК содержат факторы, определяющие плюрипотентность [8]. В своих работах, выполненных на фибробластах мыши [8], а затем и на клетках человека [9], они описали способ введения генов, играющих большую роль в раннем развитии, при помощи лентивирусных конструкций. Удалось показать, что эктопическая экспрессия генов всего четырех транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc (позже названных «каноническим» набором генов KMOS, или «коктейлем Яманаки») достаточна для репрограммирования фибробластов до плюрипотентного состояния. Полученные таким образом клетки были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (иПСК, induced pluripotent stem cells), а явление репрограммирования до плюрипотентного состояния –

индуцированной плюрипотентностью. иПСК сходны с ЭСК по многим характеристикам, включая профили экспрессии генов, морфологию, теломеразную активность, характер метилирования ДНК и модификации гистонов. Кроме того, иПСК способны генерировать клетки тканей трех зародышевых листков *in vitro*, они формируют зрелые тератомы после инъекции мышам с иммунодефицитом. На основе иПСК удалось получить химерных животных, среди потомков которых были и полученные из репрограммированных клеток [10, 11]. К сегодняшнему дню опубликовано большое количество работ, в которых сообщается о получении иПСК человека при помощи различных методов [12]. Для потенциального клинического применения разработаны способы репрограммирования клеток, более эффективные и безопасные, чем трансфекция вирусных векторов [13]. Получены иПСК от пациентов с различными наследственными заболеваниями [13, 14]. Существуют две обширные области исследований, связанных с репрограммированием клеток: фундаментальные исследования клеточной пластичности, генетических механизмов, лежащих в основе раннего развития организма и неоплазий; и технологии репрограммирования соматических клеток с целью проведения заместительной клеточной терапии [15]. Клеточные технологии с использованием иПСК способны предоставлять пациент-специфические линии клеток, в том числе от носителей наследственных заболеваний. Такие линии можно использовать при моделировании различных заболеваний и испытании новых лекарственных средств.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ ИНДУКЦИИ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

Ауторегуляторная петля. Баланс между Klf4, с-Мус. Влияние локуса *Ink4/Arf*

В настоящее время имеется много данных в пользу того, что плюрипотентность регулируется тремя транскрипционными факторами – Oct4, Sox2 и Nanog [16]. Показано [17, 18], что факторы Oct4, Sox2 и Nanog совместно активируют промоторы и собственных генов, и генов друг друга, образуя тем самым ауторегуляторную петлю. Существуют данные, указывающие на то, что ауторегуляторная петля усиливает стабильность экспрессии генов плюрипотентности [19, 20]. Рассматриваемые три фактора способны также запускать и регулировать каскады генов (до нескольких сотен) как транскрипционно активных, так и неактивных. Экспрессия генов *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* является основой транскрипционной сети, которая обеспечивает плюрипотентность ЭСК, усиливая транскрипцию генов плюрипотентности и,

в то же время, подавляя активность генов, связанных с дифференцировкой и развитием [21–23].

В своих пионерских работах Takahashi и Yamanaka, начав с анализа 24 генов, в конечном итоге выяснили, что для перехода клеток в плюрипотентное состояние достаточно четырех генов – *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*. Если первые два относятся к мастер-генам плюрипотентности, то выбор последних двух генов обусловлен иными причинами. Транскрипционный фактор с-Мус, как известно, увеличивает темпы пролиферации [24], что критически важно для успешного репрограммирования [25]. Вместе с тем гиперэкспрессия этого гена сказывается на повышении уровня белка p53. В некоторых работах показано, что экспрессия *Klf4*, с одной стороны, вызывает повышение уровня белка p21 (ингибитора циклин-зависимых киназ) [23], что приводит к угнетению пролиферации, а с другой стороны, понижает уровень p53 в клетке, что положительно сказывается на уменьшении риска апоптоза [26]. Таким образом, можно предположить, что с-Мус и *Klf4* действуют разнонаправленно и взаимно дополняют друг друга. Следовательно, для успеха репрограммирования важен баланс экспрессии этих двух генов [27].

Одной из важных характеристик плюрипотентных стволовых клеток является ингибирование локуса *Ink4/Arf*, который содержит гены *Cdkn2a* и *Cdkn2b*, кодирующие три сильных опухолевых супрессора – p16 (*Ink4a*), p19 (*Arf*), p15 (*Ink4b*). В клетках мыши именно ген *Arf* активирует p53 и p21, в то время как в клетках человека эти функции в основном берет на себя ген *Ink4a*. Показано [28], что в иПСК, как и в ЭСК, локус *Ink4/Arf* полностью подавлен при помощи эпигенетических меток домена «бивалента» (появление репрессирующих H3K27me3 модификаций гистонов), однако он может вновь активироваться при дифференцировке клеток. Oct4, Sox2, Klf4 совместно подавляют данный локус, что способствует усиленной генерации иПСК, увеличивая как кинетику репрограммирования, так и количество колоний иПСК. Также стоит отметить, что некоторые исследователи напрямую связывают активацию локуса *Ink4/Arf* с общим старением организма. Следовательно, сложнее репрограммировать клетки от пожилого донора, нежели от молодого. Подавление локуса *Ink4/Arf* в этом случае может значительно увеличить эффективность и скорость репрограммирования [25].

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов в плюрипотентных стволовых клетках

ЭСК обладают несколькими эпигенетическими характеристиками, которые отличают их от дифференцированных клеток. Например, ключевые гены плю-

рипотентности *Oct4* и *Nanog* деметилированы в ЭСК и могут активно транскрибироваться, в то время как дифференцировка приводит к подавлению этих генов посредством метилирования ДНК *de novo*. Интересно, что метки метилирования удаляются в течение процесса репрограммирования. Это позволяет реактивировать эндогенную транскрипцию этих генов [29].

Помимо метилирования ДНК, ЭСК и дифференцированные клетки различаются также паттернами модификации гистонов. Например, подавление генов, ответственных за развитие и дифференцировку ЭСК, регулируется при помощи сочетаний активирующей (H3K4me3) и репрессирующей (H3K27me3) модификаций гистонов. Регуляция транскрипции осуществляется при помощи белков группы Polycomb, которые подавляют экспрессию генов в результате связывания с гистонами, содержащими H3K27me3. Такой механизм рассматривается как инструмент транскрипционной гибкости ЭСК, обусловленной стабильной репрессией генов, связанных с развитием, без необратимой их инактивации. Принимая во внимание, что «бивалентные» домены имеются практически только в ЭСК и являются важной характеристикой плюрипотентного статуса, можно предположить, что восстановление «бивалентных» доменов представляет собой ключевой этап и в репрограммировании соматических клеток и iPСК. В ряде работ показано, что хроматин полностью репрограммированных iPСК содержит бивалентные гистоны, идентичные гистонам в ЭСК [10, 30].

На сегодняшний день нет ни одной работы, которая раскрывала бы полную картину взаимосвязи транскрипционных факторов, модификаций хроматина и каскадов генов плюрипотентности в процессе репрограммирования клеток. Тем не менее опубликовано много данных, посвященных анализу экспрессии транскрипционных факторов в ЭСК человека и мыши [31], а также в iPСК [32], которые могут быть основой для построения модели репрограммирования. Исходя из имеющихся данных, можно полагать, что *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4* составляют центральное звено процесса репрограммирования, во время которого происходит восстановление нуклеосом, сборка деацетилаз, активация белков Polycomb и ремоделирование хроматина. В работах по слиянию ЭСК и лимфоцитов Pereira и соавт. в 2010 г. показали, что компоненты комплекса Polycomb играют важную функциональную роль в эпигенетическом ремоделировании. Дефектные по белкам группы Polycomb ЭСК утрачивали способность ремоделировать геном соматических клеток [33].

Механизм, лежащий в основе подавления экспрессии генов дифференцировки в плюрипотентных клетках, включает связывание факторов плюрипо-

тентности (одного или нескольких) с промоторами целевых генов [34]. Связыванию факторов репрограммирования с их генами-мишенями могут способствовать комплексы, ремоделирующие нуклеосомы, такие, как Chd1 (chromodomain helicase DNA binding protein 1) [35] и VAF (rg/Brahma-associated factors – АТР-зависимый комплекс, перестраивающий структуру хроматина) [36]. Эти комплексы усиливают эффективность и кинетику репрограммирования. Вероятно, их регуляторная роль заключается в реактивации и поддержании экспрессии эндогенных генов плюрипотентности в отсутствие экзогенных факторов. Данное предположение основано на том, что в конце процесса репрограммирования эндогенные сигналы плюрипотентности, а также теломераза и репрессированная X-хромосома женских клеток реактивируются, в то время как работа ретровирусных генов затухает, хотя четкого разделения и взаимосвязи этих процессов нет [37].

Роль микроРНК в поддержании плюрипотентности

Во многих работах по репрограммированию соматических клеток до плюрипотентного состояния наблюдали значительное увеличение эффективности репрограммирования при добавлении гена *Lin28* в набор репрограммирующих факторов [38]. Основной вклад *Lin28* в этот процесс связывают с его участием в процессинге микроРНК (миРНК). Предполагается, что в ЭСК *Lin28* ингибирует процессинг миРНК *let7* [39], известного супрессора опухолевого роста. Он участвует в подавлении активности с-Мус. Кроме того, показано, что ключевые факторы репрограммирования *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* могут запускать семейство miR-290, члены которого в норме экспрессируются в ЭСК, принимая участие в регуляции пролиферации и самоподдержании этих клеток. Во время репрограммирования miR-290 активируется и в результате ремоделирования хроматина с помощью с-Мус [40]. Одна из мишеней транскрипционных факторов плюрипотентности *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* и *Rex1* – промотор кластера миРНК miR-302–367. Его продукты могут опосредованно индуцировать сигнальные пути TGF- β /Nodal/Activin (этот сигнальный путь играет существенную роль в поддержании плюрипотентного статуса ЭСК и в подавлении их дифференцировки), ингибируя некоторые регуляторы этого пути, что, в свою очередь, положительно сказывается на поддержании клеток в недифференцированном состоянии.

Влияние старения и иммортализации клеток на репрограммирование

Представляют интерес исследования, посвященные взаимосвязи репрограммирования с процессами

клеточного старения и иммортализации. В ранних работах неоднократно указывалось на то, что в соматических клетках в процессе репрограммирования росла теломеразная активность и значительно удлинялись теломерные участки ДНК. Репрограммированные клетки, таким образом, приобретали иммортальность, характерную для ЭСК [8, 9, 41]. Yehezkel и соавт. [42] детально изучили длину теломер, метилирование субтеломерных областей и экспрессию РНК-компонента теломеразы (TERRA, telomeric-repeat-containing RNA) в иПСК. Помимо подтверждения известных данных об активации теломеразы и удлинении теломер в иПСК, было показано, что в процессе последующей дифференцировки происходило значительное снижение экспрессии теломеразы в исследуемых клетках и сильное укорачивание теломерных областей. Результаты данной работы подтвердили важную роль теломеразы и состояния теломер в поддержании плюрипотентного статуса. Субтеломерные участки в иПСК были гиперметилированы по сравнению с исходными клетками, а уровень TERRA сравнительно увеличен. Предполагается, что регуляция экспрессии РНК-компонента теломеразы также может участвовать в процессах репрограммирования наряду с регуляцией экспрессии каталитического компонента теломеразы (TERT, Telomerase reverse transcriptase) [42].

Существенную роль экспрессии TERRA в процессах репрограммирования подтверждают результаты работы [43], в которой изучали клетки больных врожденным дискератозом (dyskeratosis congenital) – генетическим заболеванием, связанным с дисфункцией теломер из-за их преждевременного укорачивания. Вопреки ожиданиям оказалось, что клетки, репрограммированные при помощи *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*, также удлиняют теломерные участки и восстанавливают теломеразную активность. Механизм восстановления теломеразной активности авторы связали с восстановлением экспрессии TERRA [43].

В работе Utikal и соавт. показано, что приобретение иммортального статуса является критически важным и лимитирующим фактором на пути репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния, что может также указывать на сходство механизмов репрограммирования и трансформации [25].

СЛОЖНОСТЬ, СТУПЕНЧАТОСТЬ И СТОХАСТИЧНОСТЬ ПРОЦЕССА ИНДУКЦИИ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

Одну из проблем репрограммирования клеток с помощью введения транскрипционных факторов представляет низкая эффективность репрограммирования. В ранней методике трансфекции с использованием KMOS репрограммированию подверга-

лись порядка 0.01–0.1% трансфицированных клеток, что существенно ниже, чем при использовании методик клеточного слияния или ядерного переноса. Предложено несколько гипотез, объясняющих столь низкий выход репрограммированных клеток:

1) Образование иПСК требует специфически узких интервалов уровня экспрессии транскрипционных факторов. При одновременной трансфекции нескольких генов в составе лентивирусной конструкции распределение экспрессии этих генов по клеткам имеет вероятностный характер (из-за разного числа копий вируса в клетке и из-за случайной интеграции в геном). Это может быть причиной того, что только малая часть трансфицированных клеток получает «правильный» набор уровней экспрессии репрограммирующих факторов. Известно, что плюрипотентный статус ЭСК весьма чувствителен к уровням экспрессии генов плюрипотентности, например, 50%-ное изменение в уровне экспрессии *Oct4* уже приводит к дифференцировке ЭСК [44].

2) Популяции репрограммируемых соматических клеток гетерогенны сами по себе и содержат некоторое количество клеток, более подверженных репрограммированию, чем другие. Например, во время трансфекции часть клеток (скорее всего делящихся) содержит относительно деконденсированный хроматин, способствующий репрограммированию.

3) Необычно высокий уровень экспрессии экзогенных репрограммирующих факторов активирует гены, ассоциированные со стрессом и подавляющие пролиферацию. Например, в трансфицированных фибробластах возрастала экспрессия генов *Cdkn1a* и *Cdkn2a*, ингибиторов циклин-зависимых киназ, вовлеченных в различные пути дифференцировки и подавления пролиферации [45]. Этот факт связывают с введением транскрипционных факторов, так как известно, что экспрессия *Cdkn1a* запускается фактором *Klf4*, а *Cdkn2a* активируется вследствие aberrантной экспрессии *c-Myc* [46]. Таким образом, в трансфицированных клетках включаются внутренние механизмы «самосохранения», которые служат супрессорами неконтролируемой пролиферации, что в результате выражается в низком процентном содержании клеток, которым выпадает шанс преодолеть барьер супрессии пролиферации и достигнуть плюрипотентного состояния.

4) Недостаточное количество репрограммирующих факторов. При использовании методик репрограммирования при помощи клеточного слияния и переносе ядерного материала соматическая клетка или ее ядро подвергаются воздействию всех компонентов сети транскрипции плюрипотентности. Данные компоненты действуют на всех уровнях, тогда как при репрограммировании с использованием лен-

тивиральной трансфекции на клетки действует лишь ограниченное число факторов. Эти факторы могут реактивировать каскады транскрипции лишь с самого начала, что ставит процесс репрограммирования в более уязвимое положение, а также в зависимость от случайных вариаций.

На основании этих гипотез можно сделать вывод, что репрограммирование, индуцированное трансфекцией транскрипционных факторов, является низкоэффективным и ступенчатым, крайне зависящим от стохастических процессов. Важность случайных вариаций при образовании иПСК подтверждается данными о том, что получающиеся репрограммированные клетки довольно гетерогенны по общему профилю экспрессии генов плюрипотентности, эпигенетическому профилю и морфологии. Показано, что иПСК, образующиеся из одних и тех же родительских клеток, реактивируют экспрессию эндогенного *Oct4* в разное время в течение всего процесса репрограммирования, что указывает на ступенчатость эпигенетических перестроек и репрограммирования в целом [27]. Однако при сравнении рассматриваемого метода репрограммирования с ранее предложенными методиками переноса ядер и клеточных слияний нельзя не учитывать тот факт, что метод Takahashi и Yamanaka обладает рядом несомненных преимуществ, таких, как относительная дешевизна и простота методики репрограммирования. Стоит также отметить и универсальность подхода, так как удалось репрограммировать клетки человека, что было невозможно ранее.

НОВЫЕ СПОСОБЫ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ДО ПЛЮРИПОТЕНТНОГО СОСТОЯНИЯ

Первоначальный метод трансфекции репрограммирующих транскрипционных факторов с использованием лентивирусных векторов обладает рядом существенных недостатков, препятствующих его применению в клинической практике. Интеграция вируса в геном хозяина (до 20 вставок за репрограммирование) увеличивает риск опухолеобразования, так как внедрение вируса в геном клетки-мишени может случайно активировать либо инактивировать гены хозяина, повышая тем самым риск мутагенеза. Проблемой является и продолжительная сверхэкспрессия трансгенов также из-за возможного неполного подавления трансгенов во время репрограммирования и при последующей дифференцировке. Присутствие даже нескольких плюрипотентных стволовых клеток в трансплантируемой ткани может стать причиной развития опухоли [47].

Одна из стратегий решения данных проблем состоит в уменьшении количества вводимых вирус-

ных векторов, что достигается конструированием полицистронных вирусных векторов, несущих сразу несколько нужных генов. Созданы конструкции [47, 48], кодирующие четыре основных гена репрограммирования КМОС. Используя одну лентивирусную конструкцию, содержащую эти гены, удалось снизить число вирусных интеграций в геном (до 3–5 вставок на клетку) и, что немаловажно, обеспечить равномерную экспрессию всех четырех генов в одной клетке. Посредством интеграции полицистронного лентивирусного вектора, кодирующего три гена – *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* (KOS), – удалось репрограммировать мышечные фибробласты с последующим вырезанием вектора из генома. Используемый подход увеличивает привлекательность метода за счет полного удаления вирусного материала из репрограммированных клеток [49]. Подобный метод применили в работе [50], в которой использовали специальный piggyBag-транспозон, содержащий КМОС, с последующей его элиминацией для получения свободных от вектора и трансгенов иПСК, полученных из эмбриональных фибробластов мыши. Существуют работы, в которых подобную технологию применили и для клеток человека [51]. Значительным недостатком подобного подхода является сложно контролируемый процесс удаления множества транспозонов после репрограммирования, не гарантирующий стопроцентного результата.

Следующим подходом к решению проблемы вирусной интеграции в геном стал метод получения иПСК с использованием плазмидной трансфекции основных факторов плюрипотентности (КМОС или LNOS – *Lin28*, *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*), основанной на временной экспрессии введенных генов. В целом ряде работ сообщается об успешном применении этого метода для получения иПСК из различных клеточных культур, включая гепатоциты и клетки линии HEK293 [52–55]. В процессе усовершенствования метода удалось трансфицировать клетки единственной плазмидной конструкцией, кодирующей канонический набор генов КМОС. Эта конструкция удалялась из клеток после репрограммирования [54]. Необходимо отметить, что к недостаткам использования плазмидных конструкций (в сравнении с методами, основанными на вирусных векторах) относится крайне низкая эффективность репрограммирования, поскольку при помощи данного метода получили в основном иПСК из эмбриональных клеток мыши и клеточных линий, известных своей лабильностью. Однако удалось увеличить эффективность репрограммирования фибробластов человека до 1%, используя эписомные плазмидные векторы *riP/EBNA1*, кодирующие сразу шесть генов: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Lin28* и *Nanog* [56].

Другой неустраняемый недостаток методов, в которых используются плазмидные векторы, – вероятность остаточного присутствия ДНК-векторов в клетках-мишенях после репрограммирования, а следовательно, и существование теоретической возможности вставочного мутагенеза [56]. В поисках подходов, которые бы исключали вероятность встраивания чужеродной ДНК в геном хозяина, разработано несколько методов. Удалось генерировать иПСК человека при помощи трансгенного вируса Сендай, чей репродуктивный цикл основан исключительно на РНК, не содержит фазы обратной транскрипции ДНК (как у лентивирусных векторов) и интеграции в геном хозяина [57]. К преимуществам данного метода можно отнести относительно высокую интродукцию генов в клетки и ткани различного типа, к недостаткам – сложность работы с вирусом Сендай и обязательная очистка репрограммируемых клеток от реплицирующегося вируса [57].

Еще один подход репрограммирования без использования ДНК-векторов основан на доставке непосредственно в клетки белков – факторов репрограммирования. Для образования белков, которые могли бы проникать через плазматическую мембрану соматических клеток, разработан особый комплекс рекомбинантных белков, состоящих из белоктрансдуцирующей субъединицы полиаргинина, связанной со всеми четырьмя основными факторами репрограммирования – KMO5 [58]. Этот подход относительно прост, при его использовании снижается риск изменения клеток-мишеней под влиянием экзогенных генетических последовательностей [58]. Однако в более поздней работе, где объектом служили уже человеческие клетки [59], отмечена низкая эффективность данного метода. Эффективность репрограммирования с помощью белков KMO5, сцепленных с CPP (cell penetrating peptide – пептидом, содержащим большую долю основных аминокислот и способного проходить через клеточную мембрану), была равна 0.001%, что на два порядка ниже, чем в методах с вирусной интеграцией.

Следующий многообещающий способ репрограммирования соматических клеток без использования ДНК-векторов – трансфекция синтезированной *in vitro* мРНК транскрипционных факторов. Используя мРНК генов LNOS [60], исследователи смогли репрограммировать неонатальные фибробласты человека до плюрипотентного состояния. Несмотря на достигнутый результат, также отмечалась низкая эффективность репрограммирования (0.0005%). Эту проблему авторы объясняют высокой цитотоксичностью больших доз мРНК [60]. Однако преодолеть существующие трудности смогли при помощи син-

тетической мРНК генов KMO5 и *Lin28*, сконструированной из модифицированных рибонуклеотидов [61]. В комплексе с использованием ингибитора интерферонов V18R и культивированием в условиях с низким содержанием кислорода этот метод позволил добиться низкой цитотоксичности трансфекции. Благодаря таким модификациям эффективность репрограммирования возросла на два порядка и достигла 4.4% по сравнению с 0.04%, которые удается получить с использованием вирусной трансфекции. В дальнейшем была проделана масштабная работа по репрограммированию широкого спектра соматических клеток (в том числе клеток человека) и анализу полученных иПСК [61].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ ПРИ РЕПРОГРАММИРОВАНИИ

Одним из подходов к репрограммированию соматических клеток человека является применение низкомолекулярных соединений, так называемых малых молекул репрограммирования. В комбинации с ранее разработанными методами эти молекулы способны либо функционально заменить те или иные факторы репрограммирования, либо способствовать повышению эффективности процесса. Так, например, использовали VIX-01294 (VIX) – ингибитор гистонметилтрансферазы G9a. Применение этого агента в дополнение к трансфекции наборами *Klf4*, *c-Myc* и *Sox2*, а также *Klf4* и *Oct4* в составе лентивирусных векторов, значительно увеличивало (в 6–10 раз) выход репрограммированных клеток [45]. Подобный эффект связывают со специфическим действием VIX, который способствует деконденсации хроматина и соответственно может функционально заменить транскрипционный фактор *c-Myc* [45]. Другое соединение, значительно увеличивающее эффективность репрограммирования – 2-пропилвалериановая кислота (вальпроевая кислота, VPA) [62]. Она специфически ингибирует ДНК-метилтрансферазы и гистондеацетилазу. Согласно [38] использование этой малой молекулы в дополнение к стандартному набору KMO5 увеличивает эффективность репрограммирования на 1–2 порядка и также позволяет обойтись без онкогена *c-Myc*. С использованием аналогичной стратегии ингибирования ДНК-метилтрансфераз показано [29] положительное влияние 5-азациитидина (5-azaC) на выход репрограммированных клеток. Эффективность репрограммирования увеличивается также при введении малых интерферирующих РНК (siRNA), которые ингибируют транскрипты генов, связанных с коммитированием [29]. Описано положительное влияние CHIR99021, специфического ингибитора GSK-3 (glycogen synthase kinase 3), на эффективность ре-

программирования эмбриональных фибробластов мышцы. При использовании CHIR99021 удалось значительно повысить выход колоний iPСК. В ряде экспериментов использование этого реагента позволило уменьшить набор репрограммирующих факторов до двух – *Klf4* и *Oct4* [63].

Малые молекулы, такие, как ингибиторы аргининовой метилтрансферазы AMI-5 и A-83-01 и ингибитор трансформирующего фактора роста β , способствуют процессу репрограммирования [64]. Индуцировав фибробласты мышцы одним только *Oct4*, при добавлении этих двух малых соединений, удалось получить iPСК, которые экспрессировали типичные маркеры плюрипотентности, обладали способностью дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков и давать начало жизнеспособным химерным мышам. Активность AMI-5 сопоставима с действием сразу трех компонентов: CHIR99021, Parnate и VPA. AMI-5 ингибирует активность PRMT 1/3/4/6, входит в состав семейства белков, которые катализируют моноили диметилирование остатков аргинина. Однако до сих пор не установлено, как именно AMI-5 усиливает индуцированное *Oct4* репрограммирование клеток.

Любопытные результаты получены при изучении влияния витамина С на генерацию iPСК [65]. Оказалось, что обработка репрограммируемых клеток витамином С в комбинации с активацией генов *Klf4*, *c-Myc* и *Oct4* вызывает значительное снижение уровня p53 и p21, а также концентрации активных форм кислорода (АФК). Предполагается, что это усиливает эффективность репрограммирования, так как при трансфекции вирусными векторами обычно наблюдается повышение уровня АФК. На генерацию iPСК из взрослых и эмбриональных фибробластов человека положительно воздействует бутират натрия [51]. Роль данного соединения связывают с усилением экспрессии ДНК-деметилазы и H3-ацетилирования, что в конечном итоге способствует экспрессии эндогенных факторов плюрипотентности, в том числе *Oct4* и *Dppa2* (developmental pluripotency associated 2). В одной из последних работ [66], связанных с изучением роли малых молекул в процессах репрограммирования и поддержания плюрипотентного статуса, проведен скрининг различных низкомолекулярных соединений. По результатам исследования удалось подобрать «коктейль» из трех молекул – PD98059 (mitogen-activated protein kinase inhibitor), CHIR99021 (glycogen synthase kinase inhibitor) и Y27632 (Rho kinase inhibitor), который существенно влиял на способность человеческих ЭСК оставаться в недифференцированном состоянии при различных условиях культивирования.

ПРЯМОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

К направлениям, требующим особого внимания, можно отнести изучение возможности так называемого прямого репрограммирования. Эта стратегия предполагает использование различных методов для трансдифференцировки одного специализированного типа клеток в другой, минуя стадию образования плюрипотентных стволовых клеток. В случае разработки метода такого прямого репрограммирования, клеточные технологии могли бы использоваться в клинической практике.

Среди подобных исследований можно выделить работу [67], в которой при помощи аденовирусной трансфекции генов трех транскрипционных факторов – *Ngn3* (*Neurog3*), *Pdx1* и *Mafa* – репрограммировали зрелые экзокринные клетки поджелудочной железы мышцы в β -подобные клетки *in vivo*. По морфологии, ультраструктуре, экспрессии основных маркеров и главным функциям (синтез инсулина) индуцированные β -клетки не отличались от интактных [67]. Опубликованы результаты изучения влияния транскрипционного фактора *Oct4* на пластичность кератиноцитов мышцы. При помощи плазмидной трансфекции гена *Oct4* удалось получить измененную культуру клеток, которые при определенных условиях культивирования могли дифференцироваться в нейрональное направление [68]. Эта область исследования получила новый виток развития в 2010 г., когда показали [69], что кратковременной экспрессии гена *Oct4* достаточно для изменения направления дифференцировки кератиноцитов человека, в том числе в нейрональном и мезенхимальном направлениях.

Стоит также отметить работу, авторам которой удалось вызвать прямое репрограммирование эмбриональных и неонатальных фибробластов мышцы *in vitro* [70]. Применив вначале комбинацию из 19 генов, специфичных для нервных тканей и нейрогенеза, они сумели подобрать три гена, осуществляющих трансдифференцировку клеток в нейрональное направление. Ретровирусами, несущими гены *Ascl1*, *Brn2* и *Myt1l*, инфицировали культуры фибробластов и наблюдали образование функциональных нейронов со сложной морфологией. Оказалось также, что одного гена *Ascl1* достаточно для формирования таких характеристик нервных клеток, как экспрессия некоторых специфичных для нейронов потенциал-зависимых белков, необходимых для генерации потенциала действия. Однако для облегчения нейрональной конверсии клеток и их полного созревания необходима совместная экспрессия дополнительных факторов [70]. Сообщается также о сходном результате, полученном с использованием фибробластов

человека [71]: фенотип клеток удалось изменить в сторону дофаминергических нейронов при дополнительном введении в клетки генов *Lmx1a* и *FoxA2*. В качестве альтернативного источника для генерации клеток с характеристиками дофаминергических нейронов предложено использовать астроциты [72].

Несмотря на кажущуюся сложность трансдифференцировки клеток – производных одного зародышевого листка, в клетки – производные другого зародышевого листка, существуют работы, посвященные проблеме пластичности клеток, в которых доказана такая возможность *in vitro* и даже *in vivo* [73–75].

Soda и соавт. [73] удалось осуществить трансдифференцировку клеток глиобластомы в эндотелиальные клетки. Показано, что клетки глиобластомы могут трансдифференцироваться в эндотелий сосудов и давать начало функциональным кровеносным сосудам, нечувствительным к ингибированию рецептора VEGF. Результаты данного исследования указывают на существование иного механизма устойчивости клеток глиобластомы к анти-VEGF-терапии. Сообщается о репрограммировании терминально дифференцированных гепатоцитов в нейрональном направлении [74].

Опубликованы результаты успешного прямого репрограммирования фибробластов мыши и человека в нейрональном направлении дифференцировки [75]. Полученные клетки, в которых индуцировали экспрессию генов *Ascl1* (*Mash1*), *Nurr1* и *Lmx1a*, очень походили на дофаминергические нейроны мозга по продукции специфических белков и выбросу дофамина, а также по пейсмейкерной активности. Большие надежды возлагаются на получение функциональных дофаминергических нейронов непосредственно из одного типа клеток в другой с целью терапии болезни Паркинсона и ряда других нейродегенеративных заболеваний.

РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ИПСК И ЭСК. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ «ПАМЯТЬ» ИПСК

Несмотря на то что ИПСК весьма схожи с ЭСК по многим характеристикам, между клетками этих типов существуют и значительные различия, в том числе в уровнях контроля экспрессии генов плюрипотентности и в формировании жизнеспособных организмов при трансплантации этих клеток в развивающуюся бластоцисту для получения химерных мышей. Подтверждено, что уровни метилирования CpG-островков схожи в ЭСК и ИПСК [76]. При помощи полногеномного анализа CpG-островков, локализованных в функциональных регионах более 14000 генов, выявили разницу в уровнях метилирования 46 генов. Общее CpG-метилирование промоторных участков в плюрипотентных клетках выше, чем в со-

матических. Сравнили две линии ЭСК и ИПСК, полученных из генетически идентичного с ЭСК материала [77]. В тестах на получение химерных животных жизнеспособные мыши были успешно получены из двух линий ЭСК, в то время как из ИПСК не удалось получить ни одного животного. При внимательном сравнении профилей транскриптов РНК показали, что транскрипция импринтированного кластера генов *Dlk1-Dio3* в ИПСК значительно ниже, чем в линиях ЭСК. Обнаружено, что участок хромосомы 12, содержащий гены, важные для развития плода, был «выключен» в линии ИПСК. Проверили также более 60 линий ИПСК-подобных клеток, и в большинстве случаев наблюдали сходный результат. Важно отметить, что в ряде линий ИПСК этот кластер генов был активирован. Впоследствии из этих линий удалось получить живых химерных мышей. Таким образом, состояние данного импринтированного кластера позволяет ввести еще одну характеристику «полноценности» репрограммирования ИПСК [77]. ИПСК можно дифференцировать в клетки-предшественницы дефинитивной эндодермы для разработки подходов к клеточной терапии пораженных тканей эндодермального происхождения, несмотря на существование некоторых различий между ними на молекулярном уровне [78].

Предполагается, что ЭСК и ИПСК человека, помимо потенциального применения для нужд регенеративной медицины, можно использовать для моделирования наследственных болезней человека. В то же время еще до применения этих клеток в качестве модели того или иного заболевания необходимо оценить наличие в них хромосомных перестроек, которые ограничивают применение репрограммированных клеток. Выявлены значительные различия в хромосомных характеристиках ИПСК и ЭСК [79]. Получены ИПСК из клеток кожи трех больных, страдающих синдромом ломкой X-хромосомы (*fragile X syndrome*, FX), при котором наблюдается задержка умственного развития. В отличие от ЭСК больных синдромом FX, в некоторых типах дифференцированных клеток этих же больных экспрессия гена *FMR1* была снижена вследствие аномальных дупликаций триплетных повторов. Показано, что ИПСК также содержат мутантный ген *FMR1*, который не изменяется в течение репрограммирования, несмотря на плюрипотентный статус [80]. Благодаря данному исследованию стало очевидным, что ИПСК не всегда подходят для моделирования заболеваний, связанных с эпигенетическими изменениями, в том числе и с импринтингом. В похожей работе [81] проанализировали паттерны метилирования ДНК в геномах 15 клеточных линий – четырех линиях ЭСК, пяти линиях ИПСК человека и тканей, из которых эти ИПСК получены, а также

в дифференцированных клетках, полученных от упомянутых двух видов стволовых клеток. Выявлены значительные различия между иПСК и ЭСК; паттерны метилирования вблизи концов и центров хромосом в иПСК остаются такими же, как и в дифференцированных клетках, из которых они были получены. Очевидно, что репрограммирование является иным способом приобретения плюрипотентного статуса, нежели получение клеток из эмбриона. Основываясь на этих данных, можно заключить, что возможны ограничения в образовании некоторых типов клеток из репрограммированных клеток. Тот факт, что репрограммированные стволовые клетки имеют эпигенетическую «память», согласуется с опубликованными не так давно результатами сравнения иПСК, ЭСК и плюрипотентных клеток мыши, полученных методом ядерного переноса [82]. Показано, что иПСК содержат остаточные эпигенетические метки, которые, тем не менее, могут элиминироваться при длительном культивировании либо при использовании специфических агентов, перестраивающих структуру хроматина. Установлено также, что плюрипотентные стволовые клетки, полученные при переносе ядра, репрограммируют эпигенетический профиль эффективнее, чем иПСК.

иПСК не только обладают эпигенетической «памятью», их важной сравнительной характеристикой является наличие дупликаций или делеций генов, связанных с геномной нестабильностью. Используя метод генотипирования единичных нуклеотидных замов, сравнили 69 линий ЭСК, 37 линий иПСК между собой, а также с линейными и первичными культурами клеток человека [83]. Результаты этой тщательно выполненной работы говорят о том, что плюрипотентные клетки в целом, и иПСК в большей степени, склонны к накоплению дупликаций в областях генома, содержащих гены плюрипотентности и онкогены, а также делеций в области генов-супрессоров опухолевого роста.

Многие исследователи связывают различия между иПСК и ЭСК с самим методом репрограммирования и наличием вирусных вставок в геном. Сравнили транскрипционные профили ЭСК человека и иПСК методами, исключающими использование вирусных конструкций [84], и показали, что транскрипционные профили ЭСК и иПСК были в целом сходными, однако имелись различия, которые нельзя объяснить интеграцией вируса в геном.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ иПСК В КЛИНИКЕ

Трансплантация аллогенных органов связана с рядом проблем, таких, как ограниченная приживляемость тканей и необходимость применения иммуносупрессоров. Считается, что при помощи репрограммирова-

ния собственных клеток больного можно преодолеть эти проблемы, благодаря генетической идентичности пересаживаемых реципиенту клеток. Другое несомненное преимущество предлагаемой техники перед существующими трансплантационными методами – потенциальная возможность исследования и исправления патологических мутаций в клетках *in vitro*. Так, на мышинной модели осуществлена успешная коррекция серповидно-клеточной анемии при помощи иПСК [85]. В работе наблюдали образование нормальных эритроцитов из кроветворных клеток-предшественников, полученных из полностью репрограммированных клеток кожи.

Изучение и лечение многих заболеваний, таких, как сахарный диабет типа 1, болезни Паркинсона и Альцгеймера, патологии печени и др., проблематичны как из-за труднодоступности поврежденного органа и, как следствие, сложностей при поиске донорской ткани, так и из-за отсутствия способов длительного культивирования клеток соответствующих типов. При моделировании подобных заболеваний можно получать аутологичные иПСК, направлять их дифференцировку в культуре в клетки нужного типа для получения адекватных тест-систем скрининга лекарственных средств. Эти тест-системы также могут быть использованы при исследовании заболеваний, сопровождающихся патологической гибелью мотонейронов, например при амиотрофическом боковом склерозе или спинальной мышечной атрофии. Одной из проблем, связанных с изучением дегенеративных патологий, является недостаток клеточных материалов от пациентов с поздними стадиями развития заболевания. Так как иПСК, вероятно, должны *in vitro* пройти те же этапы дифференцировки, как и клетки реципиента до их «заболевания» *in vivo*, данная технология может позволить изучить ранние стадии конкретной болезни. В данной области ведутся интенсивные работы, и в некоторых лабораториях уже получены иПСК от больных, страдающих болезнью Гентингтона, серповидно-клеточной анемией, мышечной дистрофией, синдромом Дауна и др. [13, 14, 86, 87].

Выявлены существенные различия между одними и теми же типами клеток, дифференцированными из ЭСК и иПСК [88]. Изучение образования тератом у мышей линий C57BL/6 и 129/SvJ показало, что нарушение экспрессии генов в некоторых клетках, дифференцированных из иПСК, может вызвать зависимый от Т-клеток иммунный ответ у изогенного реципиента. Таким образом, существующие в настоящее время технологии репрограммирования еще далеки от клинического применения. Одна из первоочередных задач – разработка методов, позволяющих свести к минимуму эпигенетические различия между иПСК и ЭСК.

ПОДХОДЫ К КЛИНИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ИПСК

Использование онкогенов для получения ИПСК является одной из главных проблем, которая стоит на пути к терапевтическому применению этих клеток. Онкоген *c-Myc* гиперэкспрессирован примерно в 70% опухолей человека, поэтому чрезмерная экспрессия введенного трансгена создает опасность применения ИПСК [89]. Для решения этой проблемы исследовали ИПСК, полученные от человека и мыши. У химерных мышей, полученных из ИПСК без введения *c-Myc*, не возникали опухоли после рождения, тогда как у ~15% животных, полученных от ИПСК с экзогенным *c-Myc*, развивались онкологические заболевания [90]. *Oct4*, *Sox2* и *Klf4* тоже потенциально связаны с возникновением опухолей разного типа, поэтому все больше исследователей стараются избежать трансдукции этих онкогенов [54, 56, 61, 91]. Для достижения необходимого результата в некоторых случаях подбирают такие клетки-мишени, которые эндогенно экспрессируют необходимый фактор на достаточном уровне, избавляя от необходимости вводить его. Например, в нейральных стволовых клетках сильно экспрессируется эндогенный ген *Sox2*, и в ряде работ удалось репрограммировать эти клетки, вводя в них только *Oct4* и *Klf4* [45, 92] или даже один *Oct4* [92, 93]. Перспективными для репрограммирования могут считаться менингиоциты и кератиноциты, благодаря относительно высокому уровню экспрессии *Sox2* [94], *c-Myc* и *Klf4* [95, 96] соответственно. Также известно, что ИПСК легче получить из клеток амниотической жидкости ввиду их относительно слабой дифференцировки [97, 98]. Образование ИПСК из клеток амниотической жидкости происходит по крайней мере

в 2 раза быстрее, чем из фибробластов, а эффективность репрограммирования на порядок выше. Один из подходов к репрограммированию состоит в замене онкогенов малыми молекулами [38, 45]. Важную проблему представляет тератогенность ИПСК, так как при их дифференцировке в специализированные клетки, предназначенные для трансплантации, может сохраниться некоторое количество недифференцированных ИПСК, представляющих опасность для реципиента [99]. Продолжаются поиски методов селекции, гарантирующих отделение ИПСК от дифференцированных клеток. Изучение хромосомного состава ЭСК и ИПСК выявило кариотипическую нестабильность линий плюрипотентных клеток [100], что указывает на необходимость тщательного цитогенетического анализа ИПСК, а также исходных клеточных линий.

Сходства и различия между ЭСК и ИПСК активно изучаются на молекулярном и функциональном уровнях. Результаты этих работ могут повлиять на терапевтическую пригодность ИПСК. Данная область исследований требует анализа геномного и эпигеномного статуса ИПСК человека, как и разработка и оптимизация протоколов дифференцировки, а также выработка надежных критериев функциональности специализированных клеток, полученных из ИПСК. ●

Работа поддержана ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2007–2012 годы» (Государственный контракт № 16.512.11.2106, шифр 2011-1.2-512-050-068).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Evans M.J., Kaufman M.H. // Nature. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. // Science. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
- Wilmot I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. // Nature. 1997. V. 385. № 6619. P. 810–813.
- Wakayama T., Perry A., Zuccotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R. // Nature. 1998. V. 394. № 6691. P. 369–374.
- Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmot I. // Nature. 1996. V. 380. № 6569. P. 64–66.
- Byrne J.A., Pedersen D.A., Clepper L.L., Nelson M., Sanger W.G., Gokhale S., Wolf D.P., Mitalipov S.M. // Nature. 2007. V. 450. № 7169. P. 497–502.
- Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada T. // Curr. Biol. 2001. V. 11. № 19. P. 1553–1558.
- Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // Cell. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
- Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., Jaenisch R. // Nature. 2007. V. 448. № 7151. P. 318–324.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. // Nature. 2007. V. 448. № 7151. P. 313–317.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. // Science. 2007. V. 318. № 5858. P. 1917–1920.
- Park I.H., Arora N., Huo H., Maherali N., Ahfeldt T., Shimamura A., Lensch M.W., Cowan C., Hochedlinger K., Daley G.Q. // Cell. 2008. V. 134. № 5. P. 877–886.
- Soldner F., Hockemeyer D., Beard C., Gao Q., Bell G.W., Cook E.G., Hargus G., Blak A., Cooper O., Mitalipova M., et al. // Cell. 2009. V. 136. № 5. P. 964–977.
- Ho R., Chronis C., Plath K. // J. Cell Physiol. 2011. V. 226. № 4. P. 868–878.
- Niwa H. // Development. 2007. V. 134. № 4. P. 635–646.
- Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L., Vega V.B., Zhang W., Chen X., Bourque G., George J., Leong B., Liu J., et al. // Nat. Genet. 2006. V. 38. № 4. P. 431–440.

18. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnstone S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., et al. // *Cell*. 2005. V. 122. № 6. P. 947–956.
19. Rosenfeld N., Elowitz M.B., Alon U. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 323. № 5. P. 785–793.
20. Alon U. // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. № 6. P. 450–461.
21. Hyslop L., Stojkovic M., Armstrong L., Walter T., Stojkovic P., Przyborski S., Herbert M., Murdoch A., Strachan T., Lako M. // *Stem Cells*. 2005. V. 23. № 8. P. 1035–1043.
22. Kuroda T., Tada M., Kubota H., Kimura H., Hatano S.Y., Suemori H., Nakatsuji N., Tada T. // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. № 6. P. 2475–2485.
23. Rodda D.J., Chew J.L., Lim L.H., Loh Y.H., Wang B., Ng H.H., Robson P. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 26. P. 24731–24737.
24. Seoane J., Le H.V., Massagué J. // *Nature*. 2002. V. 419. № 6908. P. 729–734.
25. Utikal J., Polo J.M., Stadtfeld M., Maherali N., Kulalert W., Walsh R.M., Khalil A., Rheinwald J.G., Hochedlinger K. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7259. P. 1145–1148.
26. Rowland B.D., Bernards R., Peeper D.S. // *Nat. Cell Biol.* 2005. V. 7. № 11. P. 1074–1082.
27. Scheper W., Copray S. // *Stem Cell Rev.* 2009. V. 5. № 3. P. 204–223.
28. Li H., Collado M., Villasante A., Strati K., Ortega S., Cañamero M., Blasco M.A., Serrano M. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7259. P. 1136–1139.
29. Mikkelsen T.S., Hanna J., Zhang X., Ku M., Wernig M., Schorderet P., Bernstein B.E., Jaenisch R., Lander E.S., Meissner A. // *Nature*. 2008. V. 454. № 7205. P. 49–55.
30. Bernstein B.E., Mikkelsen T.S., Xie X., Kamal M., Huebert D.J., Cuff J., Fry B., Meissner A., Wernig M., Plath K., et al. // *Cell*. 2006. V. 125. № 2. P. 315–326.
31. Kunarso G., Chia N.Y., Jeyakani J., Hwang C., Lu X., Chan Y.S., Ng H.H., Bourque G. // *Stem Cells. Nat. Genet.* 2010. V. 42. № 7. P. 631–634.
32. Sridharan R., Tchieu J., Mason M.J., Yachechko R., Kuoy E., Horvath S., Zhou Q., Plath K. // *Cell*. 2009. V. 136. № 2. P. 364–377.
33. Pereira C.F., Piccolo F.M., Tsubouchi T., Sauer S., Ryan N.K., Bruno L., Landeira D., Santos J., Banito A., Gil J., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 6. № 6. P. 547–556.
34. Kim J., Chu J., Shen X., Wang J., Orkin S.H. // *Cell*. 2008. V. 132. № 6. P. 1049–1061.
35. Gaspar-Maia A., Alajem A., Polesso F., Sridharan R., Mason M.J., Heidersbach A., Ramalho-Santos J., McManus M.T., Plath K., Meshorer E., et al. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7257. P. 863–868.
36. Singhal N., Graumann J., Wu G., Arauz Zo-Bravo M.J., Han D.W., Greber B., Gentile L., Mann M., Schöler H.R. // *Cell*. 2010. V. 141. № 6. P. 943–955.
37. Stadtfeld M., Maherali N., Breault D.T., Hochedlinger K. // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 2. № 3. P. 230–240.
38. Huangfu D., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Snitow M., Chen A.E., Melton D.A. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 7. P. 795–797.
39. Viswanathan S.R., Daley G.Q., Gregory R.I. // *Science*. 2008. V. 320. № 5872. P. 97–100.
40. Ralston A., Rossant J. // *Reproduction*. 2010. V. 139. № 1. P. 35–44.
41. Mathew R., Jia W., Sharma A., Zhao Y., Clarke L.E., Cheng X., Wang H., Salli U., Vrana K.E., Robertson G.P., et al. // *FASEB J.* 2010. V. 24. № 8. P. 2702–2715.
42. Yehezkel S., Rebibo-Sabbah A., Segev Y., Tzukerman M., Shaked R., Huber I., Gepstein L., Skorecki K., Selig S. // *Epigenetics*. 2011. V. 6. № 1. P. 63 – 75.
43. Agarwal S., Loh Y.H., McLoughlin E.M., Huang J., Park I.H., Miller J.D., Huo H., Okuka M., Dos Reis R.M., Loewer S., et al. // *Nature*. 2010. V. 464. № 7286. P. 292–296.
44. Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. // *Nature Genet.* 2000. V. 24. № 4. P. 372–376.
45. Shi Y., Do J.T., Despons C., Hahm H.S., Schöler H.R., Ding S. // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 2. № 6. P. 525–528.
46. Wernig M., Meissner A., Cassady J.P., Jaenisch R. // *Cell Stem Cell*. 2008. V. 2. № 1. P. 10–12.
47. Carey B.W., Markoulaki S., Hanna J., Saha K., Gao Q., Mitalipova M., Jaenisch R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 1. P. 157–162.
48. Sommer C.A., Stadtfeld M., Murphy G.J., Hochedlinger K., Kotton D.N., Mostoslavsky G. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. № 3. P. 543–549.
49. Chang C.W., Lai Y.S., Pawlik K.M., Liu K., Sun C.W., Li C., Schoeb T.R., Townes T.M. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. № 5. P. 1042–1049.
50. Woltjen K., Michael I.P., Mohseni P., Desai R., Mileikovsky M., Hämmäläinen R., Cowling R., Wang W., Liu P., Gertsenstein M., et al. // *Nature*. 2009. V. 458. № 7239. P. 766–770.
51. Mali P., Chou B., Yen J., Ye Z., Zou J., Dowey S., Brodsky R.A., Ohm J.E., Yu W., Baylin S.B., et al. // *Stem Cells*. 2010. V. 28. № 4. P. 713–720.
52. Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T., Yamanaka S. // *Science*. 2008. V. 322. P. 949–953.
53. Stadtfeld M., Nagaya M., Utikal J., Weir G., Hochedlinger K. // *Science*. 2008. V. 322. № 5903. P. 945–949.
54. Kaji K., Norrby K., Paca A., Mileikovsky M., Mohseni P., Woltjen K. // *Nature*. 2009. V. 458. № 7239. P. 771–775.
55. Jia F., Wilson K.D., Sun N., Gupta D.M., Huang M., Li Z., Panetta N.J., Chen Z.Y., Robbins R.C., Kay M.A., et al. // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. № 3. P. 197–199.
56. Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., Tian S., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. // *Science*. 2009. V. 324. № 5928. P. 797–801.
57. Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., Saeki K., Hasegawa M. // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2009. V. 85. № 8. P. 348–362.
58. Zhou H., Wu S., Joo J.Y., Zhu S., Han D.W., Lin T., Trauger S., Bien G., Yao S., Zhu Y., et al. // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. № 5. P. 381–384.
59. Kim D., Kim C.H., Moon J.I., Chung Y.G., Chang M.Y., Han B.S., Ko S., Yang E., Cha K.Y., Lanza R., Kim K.S. // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. № 6. P. 472–476.
60. Yakubov E., Rechavi G., Rozenblatt S., Givol D. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 394. № 1. P. 189–193.
61. Warren L., Manos P.D., Ahfeldt T., Loh Y.H., Li H., Lau F., Ebina W., Mandal P.K., Smith Z.D., Meissner A., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 7. № 5. P. 618–630.
62. Medvedev S.P., Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Malakhova A.A., Demyntseva E.V., Shilov A.A., Pokushalov E.A., Zaidman A.M., Aleksandrova M.A., Plotnikov E.Y., et al. // *Stem Cells Dev.* 2011. V. 20. № 6. P. 1099–1112.
63. Li W., Zhou H., Abujarour R., Zhu S., Young Joo J., Lin T., Hao E., Schöler H.R., Hayek A., Ding S. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. № 12. P. 2992–3000.
64. Yuan X., Wan H., Zhao X., Zhu S., Zhou Q., Ding S. // *Stem Cells*. 2011. V. 29. № 3. P. 549–553.
65. Esteban M.A., Wang T., Qin B., Yang J., Qin D., Cai J., Li W., Weng Z., Chen J., Ni S., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 6. № 1. P. 71–79.
66. Tsutsui H., Valamehr B., Hindoyan A., Qiao R., Ding X., Guo S., Witte O.N., Liu X., Ho C.M., Wu H. // *Nat. Commun.* 2011. V. 2. P. 167.
67. Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D.A. // *Nature*. 2008. V. 455. № 7213. P. 627–632.

68. Grinnell K.L., Yang B., Eckert R.L., Bickenbach J.R. // *J. Invest. Dermatol.* 2007. V. 127. № 12. P. 372–380.
69. Racila D., Winter M., Said M., Tomanek-Chalkley A., Wiechert S., Eckert R.L., Bickenbach J.R. // *Gene Ther.* 2010. V. 18. № 3. P. 294–303.
70. Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P., Kokubu Y., Südhof T.C., Wernig M. // *Nature.* 2010. V. 463. № 7284. P. 1035–1041.
71. Pfisterer U., Kirkeby A., Torper O., Wood J., Nelander J., Dufour A., Björklund A., Lindvall O., Jakobsson J., Parmar M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 25. P. 10343–10348.
72. Addis R.C., Hsu F.C., Wright R.L., Dichter M.A., Coulter D.A., Gearhart J.D. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 12. e28719. P. 1–8.
73. Soda Y., Marumoto T., Friedmann-Morvinski D., Soda M., Liu F., Michiue H., Pastorino S., Yang M., Hoffman R.M., Kesari S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 11. P. 4274–4280.
74. Marro S., Pang Z.P., Yang N., Tsai M.C., Qu K., Chang H.Y., Südhof T.C., Wernig M. // *Cell Stem Cell.* 2011. V. 9. № 4. P. 374–382.
75. Caiazzo M., Dell'Anno M.T., Dvoretzkova E., Lazarevic D., Taverna S., Leo D., Sotnikova T.D., Menegon A., Roncaglia P., Colciago G., et al. // *Nature.* 2011. V. 476. № 7359. P. 224–227.
76. Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Glazov E.A., Zhang P., Rizvanov A.A., Chestkov I.V., Kiselev S.L. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. № 5. P. 937–946.
77. Stadtfeld M., Apostolou E., Akutsu H., Fukuda A., Follett P., Natesan S., Kono T., Shioda T., Hochedlinger K. // *Nature.* 2010. V. 465. № 7295. P. 175–181.
78. Christodoulou C., Longmire T.A., Shen S.S., Bourdon A., Sommer C.A., Gadue P., Spira A., Gouon-Evans V., Murphy G.J., Mostoslavsky G., et al. // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 121. № 6. P. 2313–2325.
79. Urbach A., Bar-Nur O., Daley G.Q., Benvenisty N. // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 6. № 5. P. 407–411.
80. Mitalipov S., Wolf D. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2009. V. 114. P. 185–199.
81. Lister R., Pelizzola M., Kida Y.S., Hawkins R.D., Nery J.R., Hon G., Antosiewicz-Bourget J., O'Malley R., Castanon R., Klugman S., et al. // *Nature.* 2011. V. 471. № 7336. P. 68–73.
82. Kim K., Doi A., Wen B., Ng K., Zhao R., Cahan P., Kim J., Aryee M.J., Ji H., Ehrlich L.I. // *Nature.* 2010. V. 467. № 7313. P. 285–290.
83. Laurent L.C., Ulitsky I., Slavin I., Tran H., Schork A., Morey R., Lynch C., Harness J.V., Lee S., Barrero M.J., et al. // *Cell Stem Cell.* 2011. V. 8. № 1. P. 106–118.
84. Marchetto M.C., Yeo G.W., Kainohana O., Marsala M., Gage F.H., Muotri A.R. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 9. P. e7076.
85. Hanna J., Wernig M., Markoulaki S., Sun C.W., Meissner A., Cassady J.P., Beard C., Brambrink T., Wu L.C., Townes T.M., et al. // *Science.* 2007. V. 318. № 5858. P. 1920–1923.
86. Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K., Weisenthal L.M., Mitsumoto H., Chung W., Croft G.F., Saphier G., Leibel R., Goland R., et al. // *Science.* 2008. V. 321. № 5893. P. 1218–1221.
87. Raya A., Rodríguez-Pizà I., Guenechea G., Vassena R., Navarro S., Barrero M.J., Consiglio A., Castellà M., Ríó P., Sleep E., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. № 7251. P. 53–59.
88. Zhao T., Zhang Z.N., Rong Z., Xu Y. // *Nature.* 2011. V. 474. № 7350. P. 212–215.
89. Dang C.V., O'Donnell K.A., Zeller K.I., Nguyen T., Osthus R.C., Li F. // *Semin. Cancer Biol.* 2006. V. 16. № 4. P. 253–264.
90. Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochizuki Y., Takizawa N., Yamana S. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 1. P. 101–106.
91. Maekawa M., Yamaguchi K., Nakamura T., Shibukawa R., Kodanaka I., Ichisaka T., Kawamura Y., Mochizuki H., Goshima N., Yamana S. // *Nature.* 2011. V. 474. № 7350. P. 225–229.
92. Kim J.B., Zaehres H., Araúzo-Bravo M.J., Schöler H.R. // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. № 10. P. 1464–1470.
93. Kim J.B., Sebastiano V., Wu G., Arauzo-Bravo M.J., Sasse P., Gentile L., Ko K., Ruau D., Ehrlich M., van den Boom D., et al. // *Cell.* 2009. V. 136. № 3. P. 411–419.
94. Qin D., Gan Y., Shao K., Wang H., Li W., Wang T., He W., Xu J., Zhang Y., Kou Z., et al. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 48. P. 33730–33735.
95. Maherali N., Ahfeldt T., Rigamonti A., Utikal J., Cowan C., Hochedlinger K. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 11. № 3. P. 340–345.
96. Aasen T., Raya A., Barrero M.J., Garreta E., Consiglio A., Gonzalez F., Vassena R., Bilić J., Pekarik V., Tiscornia G., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 11. P. 1276–1284.
97. Zhao H.X., Li Y., Jin H.F., Xie L., Liu C., Jiang F., Luo Y.N., Yin G.W., Li Y., Wang J., et al. // *Differentiation.* 2010. V. 80. № 2–03. P. 123–129.
98. Galende E., Karakikes I., Edelmann L., Desnick R.J., Kerenyi T., Khoueiry G., Lafferty J., McGinn J.T., Brodman M., Fuster V., et al. // *Cell Reprogram.* 2010. V. 12. № 2. P. 117–125.
99. Wernig M., Zhao J.P., Pruszak J., Hedlund E., Fu D., Soldner F., Broccoli V., Constantine-Paton M., Isacson O., Jaenisch R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 15. P. 5856–5861.
100. Минина Ю.М., Жданова Н.С., Шилов А.Г., Толкунова Е.Н., Лисковых М.А., Томилин А.Н. // *Цитология.* 2010. Т. 52. № 5. С. 420–425.

УДК 612.017.1 : 57.04

Регуляция иммунитета мультипотентными мезенхимными стромальными клетками

Ю. П. Рубцов^{1*}, Ю. Г. Суздальцева², К. В. Горюнов¹, Н. И. Калинина¹, В. Ю. Сысоева¹,
В. А. Ткачук¹

¹Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119192, Москва, Ломоносовский просп., 31, корп. 5

²Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ и СР РФ, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

*E-mail: yrubtsov@gmail.com

Поступила в редакцию 15.11.2011 г.

РЕФЕРАТ Клетки иммунной системы отвечают за развитие процесса воспаления и участвуют в повреждении тканей и органов как при травмах, так и при различных патологиях. Контроль активации клеток иммунной системы помог бы достичь значительного прогресса в регенеративной медицине, лечении больных с аутоиммунными и дегенеративными заболеваниями. Доказано, что мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) способны супрессировать иммунный ответ за счет ингибирования созревания дендритных клеток, угнетения функции Т- и В-лимфоцитов, профессиональных киллеров при аутоиммунных и воспалительных заболеваниях. МСК легко выделить практически из любой ткани или органа и размножить в культуре. Эти клетки способны к самоподдержанию и дифференцировке в клетки мезодермального листа. В настоящем обзоре собраны и проанализированы данные о молекулярных механизмах, обеспечивающих взаимное влияние МСК и клеток иммунитета, которые могут быть использованы при разработке новых подходов к терапии аутоиммунных заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА иммунная система, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, воспаление, аутоиммунные заболевания, регенерация, иммуносупрессия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; CD – кластер дифференцировки; SDF-1 – фактор, секретируемый стволовыми клетками 1; CXCR4 – С-Х-С-рецептор хемокинов 4; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1; BDNF – нейротрофический фактор мозга; TGF- β – трансформирующий фактор роста β ; BMP – морфогенетический белок костной ткани; IL-10 – интерлейкин-10; TNF- α – фактор некроза опухолей α ; NK-клетки – натуральные киллеры; ДК – дендритные клетки; IFN- γ – интерферон γ ; МНС – главный комплекс гистосовместимости; IDO – индоламин-2,3-дезоксигеназа; PGE2 – простагландин E2; ICAM – молекула межклеточной адгезии; VCAM – молекула адгезии клеток сосудов; IL-1 β – интерлейкин-1 β ; GVHD – реакция трансплантат против хозяина; ЕАЕ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит; TLR – Толл-подобный рецептор; HLA-G5 – неклассическая молекула антигена комплекса гистосовместимости I класса, G5.

ВВЕДЕНИЕ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МСК

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (далее МСК) были впервые охарактеризованы в пионерской работе группы Фриденштейна в 1971 г. [1]. В этом исследовании было показано, что из клеток костного мозга можно выделить гетерогенную фракцию клеток, которые морфологически напоминают фибробласты и способны к прикрепленному росту в культуре, выдерживая множественные пассажы. Эти клетки экспрессируют на поверхности набор маркеров, который свидетельствует об их мезенхимном происхождении, и способны к дифференци-

ровке в клетки жировой ткани, кости, хряща [1] и, в меньшей степени, другие типы клеток. Набор маркеров, характерных для МСК, представлен CD105, CD166, CD54, CD90, CD55, CD13, CD73, Stro-1, CD44, в то же время гемопоэтические маркеры CD14, CD45, CD34 и CD133 [2] на поверхности МСК отсутствуют. Позднее установили, что клетки с похожими свойствами можно выделить не только из костного мозга, но и из других источников, в частности жировой ткани [3].

Более детальное изучение свойств МСК показало, что из части единичных клеток можно получить

клоны, способные к самоподдержанию в культуре [4]. Популяции МСК из разных источников можно пассировать в культуре, в отличие от терминально дифференцированных клеток, при этом гетерогенность культуры сильно зависит от пассажа [5]. Скорость роста и деления МСК в культуре постепенно снижается, и за это отвечает процесс укорочения теломер на концах хромосом [6, 7].

Отсутствие «надежных» поверхностных маркеров сильно затрудняет идентификацию и изучение МСК *in vivo*, поэтому до сих пор непонятно, являются ли МСК артефактом выделения и культивирования сложной смеси клеток *in vitro* или эта популяция действительно существует в организме. Мнения о природе МСК существенно различаются. В ряде работ наглядно показано, что по многим параметрам МСК напоминают фибробласты – другой вид клеток стромы [8]. В отдельных работах МСК сравнивают с популяцией перицитов – клеток, ассоциированных с эндотелием сосудов и несущих на поверхности набор маркеров, немногим отличающийся от такового у МСК [9, 10]. Тем не менее интерес исследователей и медиков к МСК, в первую очередь, обусловлен уникальными свойствами МСК, которые делают их привлекательным объектом для клеточной и генетической терапии, отодвигая вопросы их происхождения и филогении на второй план.

МСК МИГРИРУЮТ В ОЧАГ ПОВРЕЖДЕНИЯ

МСК, при их введении животным с индуцированными повреждениями или патологией внутренних органов, способны мигрировать к месту повреждения или в очаг воспаления. Об этом свидетельствуют результаты экспериментов по системному введению МСК, меченных различными способами (использовали клетки, экспрессирующие флуоресцирующий белок, клетки доноров-самцов переносили реципиентам-самкам, человеческие клетки использовали для гетерологичного переноса в мышей или крыс), реципиентам с такими повреждениями [11–15]. В течение короткого времени перенесенные клетки удается обнаружить в месте повреждения. Миграция МСК к месту повреждения (воспаления) зависит от хемокинов, о чем косвенно свидетельствуют результаты анализа экспрессии рецепторов хемокинов МСК. МСК экспрессируют целый спектр рецепторов хемокинов [16–18]. Вклад большинства из них в направленную миграцию МСК не установлен, однако показано, что ключевую роль играет рецептор хемокина SDF-1, C-X-C-рецептор хемокинов 4 (CXCR4). Уровень CXCR4 значительно возрастает в клетках в условиях стресса [16, 19, 20]. Блокирование сигнала через этот рецептор биохимическими или генетическими методами приводит к наруше-

нию миграции МСК в очаг повреждения/воспаления [19]. Роль CXCR4 крайне важна, так как этот рецептор также отвечает за удержание гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге. Конкуренция МСК и гемопоэтических клеток за лиганд SDF-1, может приводить к выходу стволовых клеток из костного мозга при системных поражениях [21, 22]. Раньше было принято считать, что миграция МСК в поврежденную ткань свидетельствует об их активном участии в репарации и регенерации тканей. При более детальном исследовании поведения и миграции МСК при гетерологическом переносе выяснилось, что при пересадке МСК процент клеток, достигающих очага повреждения, очень мал. Более того, клетки не задерживаются в ткани, а достаточно быстро исчезают. В связи с этим была пересмотрена исходная концепция, которая предполагала, что основная функция МСК заключается в непосредственном замещении поврежденных клеток ткани за счет дифференцировки [10]. Вместо этого предложена гипотеза, которая подразумевает, что при стрессе и повреждении МСК могут за счет секреции растворимых факторов регулировать состояние резидентных стволовых клеток и клеток-предшественников, способствуя их делению и дифференцировке [23]. Таким образом, для МСК была предложена роль мобильных поставщиков факторов, необходимых для регенерации и ремоделирования ткани.

СЕКРЕТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МСК И РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ

МСК обладают необычной способностью секретировать широкий спектр биологически активных молекул, в частности факторы роста, цитокины, гормоны и низкомолекулярные медиаторы, которые регулируют ключевые физиологические процессы [23]. Продукция этих факторов, а также умение МСК вырабатывать/разрушать внеклеточный матрикс лежат в основе физиологического эффекта, который МСК оказывают на поврежденную ткань [24–26]. Так, показано, что продукция растворимых факторов МСК способна поддерживать как клетки ткани, так и резидентные стволовые клетки и клетки-предшественники в условиях гипоксии и воспаления, которыми неизбежно сопровождаются раневые и патологические повреждения [27–29]. Доказано, что секреция МСК проангиогенных факторов, таких, как VEGF, IGF-1 и ряда других, ускоряет рост и созревание сосудов в очаге повреждения [30–32], нейротрофных факторов, в особенности BDNF, – восстановление поврежденных нейронов [33–35], а морфогенов семейства TGF- β , таких, как BMP-2, -4 и -7, способствует восстановлению костной и хрящевой

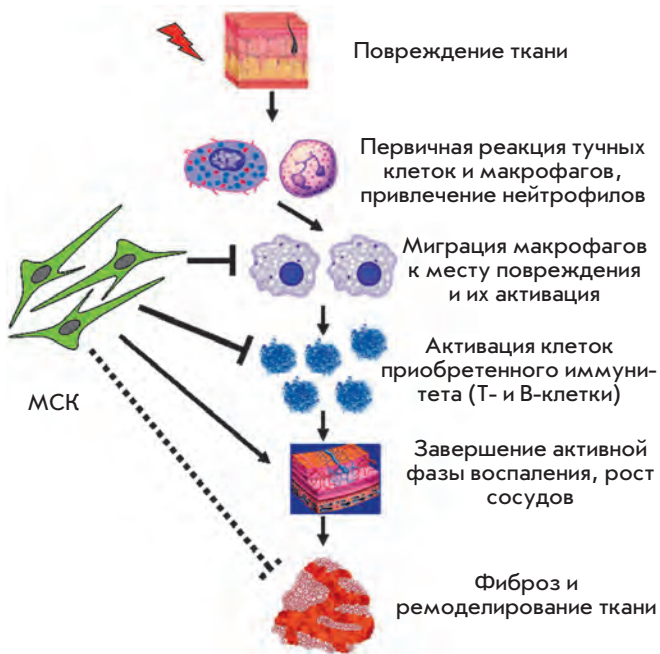


Рис. 1. Последовательность событий при повреждении/воспалении ткани и участие в них клеток иммунной системы. Положительный эффект MSC на отдельные стадии показан стрелками, негативное/ингибирующее действие отмечено затупленными стрелками.

ткани при переломах [36–38] (рис. 1). Не исключено, что прямые контакты с окружающими клетками и структурами (микроокружением) также играют немаловажную роль в регенеративной функции MSC, однако экспериментальные работы, поддерживающие это мнение, немногочисленны.

ИММУННЫЕ КЛЕТКИ В ПОВРЕЖДЕНИИ ТКАНЕЙ И РЕГЕНЕРАЦИИ

Рассматривая специфические условия, которые сопутствуют процессам заживления и регенерации тканей, следует особо отметить вклад в этот процесс клеток иммунной системы. Ни для кого не секрет, что иммунная система млекопитающих, в том числе человека, представляет собой сложный защитный механизм, состоящий из многих типов клеток, которые успешно справляются с инфекционными агентами различной природы. Эволюционно наиболее древняя часть иммунитета представлена клетками, которые отвечают за распознавание чужеродных молекул и немедленную реакцию на их присутствие [39]. Эти клетки путем предоставления молекулярных сигналов передают эстафету клеткам приобретенного (адаптивного) иммунитета, которые отвечают за развитие мощного ответа, как правило, сопровождающегося выделением значительных количеств

цитотоксических и провоспалительных молекул [40, 41]. К сожалению, непросто контролировать такой мощный и сложный механизм и точно дозировать силу и направление ударов. Расплатой за это служит чрезмерное повреждение тканей и органов, сопровождающее иммунный ответ в острой или хронической форме [39].

Существует вполне определенная последовательность реакций иммунной системы, которые сопровождают любое повреждение внутренних органов, ранение или инфекцию. В качестве сенсоров повреждения выступают тканерезидентные тучные клетки, дендритные клетки (ДК) и макрофаги [38]. Они запускают цепочку иммунных реакций, выбрасывая провоспалительные цитокины, хемокины и факторы, которые обеспечивают миграцию и стимуляцию других типов клеток. Важнейшую роль в этом процессе играют цитокины и молекулы адгезии, которые обеспечивают быстрое накопление нейтрофилов в участке повреждения [39]. Продукция цитокинов и хемокинов нейтрофилами, в свою очередь, приводит к миграции макрофагов и выбросу ими еще больших количеств провоспалительных цитокинов, таких, как $IFN-\gamma$ и $TNF-\alpha$ [40]. Секреция еще больших количеств цитокинов воспаления рекрутирует Т- и В-клетки, ускоряя их активацию и созревание. Они накапливаются в зоне повреждения, значительно усиливая воспаление за счет выработки новых доз цитокинов и провоспалительных факторов, что нередко приводит к нежелательному повреждению и гибели окружающих клеток ткани [41–44]. Воспалительный ответ, в свою очередь, запускает молекулярные механизмы, которые сдерживают активацию и деление клеток иммунной системы. Эти механизмы включают увеличение чувствительности активированных клеток к апоптозу, повышение уровня рецепторов к противовоспалительным цитокинам ($IL-10$ и $TGF-\beta$) на поверхности иммунных клеток и продукции этих цитокинов активированными клетками, негативных коактиваторных молекул, активацию и увеличение количества регуляторных клеток [45–47]. Все эти события приводят к завершению острой фазы иммунного ответа, гибели поврежденных и активированных клеток, фагоцитозу клеточных остатков профессиональными фагоцитами [48]. В то же время продукция таких факторов, как $TGF-\beta$, способствует фиброзным изменениям в структуре ткани, способствуя замещению исходной ткани фибрином и соединительной тканью [49, 50]. Немаловажную роль при этом играют как клетки окружающей ткани, которые в составе внеклеточного матрикса предоставляют факторы роста и цитокины, так и клетки эндотелия сосудов, которые обеспечивают миграцию нужных клеток в очаг повреждения [51]. Суммируя сказанное выше,

следует подчеркнуть, что клетки иммунной системы вовлечены во все фазы регенеративных процессов в тканях (рис. 1). От их участия во многом зависит то, как быстро и насколько продуктивно будет происходить заживление. Кроме того, уровень воспаления и повреждения в ткани в значительной мере зависит от взаимодействия клеток ткани и клеток иммунной системы.

ПРЕЗЕНТАЦИЯ АНТИГЕНОВ МСК

Принимая во внимание секреторный потенциал МСК, а также влияние на микроокружение в очаге повреждения, позитивный эффект МСК в различных моделях регенерации тканей можно, по крайней мере отчасти, объяснить их влиянием на клетки иммунной системы (рис. 1). В связи с этим иммунологические свойства МСК достаточно подробно изучены, чего, к сожалению, пока нельзя сказать о молекулярных механизмах, которые обуславливают эти свойства. Иммунологически МСК сильно отличаются от соматических клеток тем, что они практически не узнаются иммунной системой ввиду их фенотипических особенностей [52, 53]. Это свойство МСК делает их привлекательным объектом для трансплантологии, так как позволяет обойти проблему иммунологической совместимости. МСК по сравнению с другими типами клеток экспрессируют крайне незначительные количества молекул МНС I и МНС II и не несут костимуляторных молекул CD40, CD80 и CD86, которые необходимы для активации Т-клеток [54]. В то же время в ходе дифференцировки экспрессия МНС восстанавливается, что приводит к узнаванию и уничтожению потомства МСК клетками иммунной системы реципиента [55]. В полностью гетерологичных культурах МСК не вызывают аллогенной смешанной реакции лимфоцитов [54]. Экспрессия МНС МСК может изменяться в зависимости от условий культивирования. В частности, в присутствии небольших концентраций IFN- γ МСК активируют экспрессию генов МНС, что в результате приводит к их способности презентировать антиген (*in vitro*). Большие дозы IFN- γ не оказывают такого эффекта [56].

В течение последних лет показано, что МСК могут супрессировать иммунный ответ, замедляя созревание ДК, подавляя функции Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и натуральных киллеров (НК) [57–60].

ИММУНОРЕГУЛЯЦИЯ МСК *IN VITRO*

Большая часть данных об иммунологических свойствах МСК получена в экспериментах по сокультивированию или совместной инкубации МСК и клеток иммунной системы *in vitro*. В экспериментах данного типа лейкоциты крови человека или индивидуальные

популяции, например Т-клетки, после активации помещают в культуру с МСК. После чего влияние МСК на иммунные клетки и, наоборот, влияние иммунных клеток на МСК определяют, измеряя скорость деления клеток, их метаболическую активность, уровень экспрессии маркеров активации, уровень апоптоза, секрецию цитокинов и факторов роста и т.д. В результате установлены основные закономерности и механизмы, влияющие на результат взаимодействия МСК и клеток иммунной системы [57–60] (рис. 2, 3). Оказалось, что МСК по-разному воздействуют на различные типы клеток иммунной системы. Наивные (неактивированные) Т-клетки лучше выживают и делятся в культуре в присутствии МСК и супернатантов культур МСК. В то же время активированные Т-клетки подвержены иммуносупрессии в присутствии МСК. Установлено, что МСК снижали пролиферативный потенциал Т-клеток, экспрессию маркеров активации и коактиваторных молекул, способность секретировать провоспалительные цитокины, такие, как IFN- γ и TNF- α [58, 59, 61]. Похожий эффект наблюдали и в случае дендритных клеток. Сокультивирование ДК человека или мыши с МСК приводило к тому, что созревание ДК, проявляющееся в экспрессии на поверхности клеток молекул главного комплекса гистосовместимости, способности процессировать и представлять белковый антиген в виде пептидов CD4 и CD8 Т-клеткам, было снижено по сравнению с контрольными сокультурами [60, 62, 63]. Эффект состоял также в снижении уровня костимуляторных молекул, необходимых для продуктивной презентации антигенов Т-клеткам. Кроме того, МСК негативно влияют на активацию других видов иммунных клеток в культуре, в частности NK [64, 65] и В-клеток [57, 66, 67]. В случае В-клеток наблюдают замедление деления и секреции иммуноглобули-

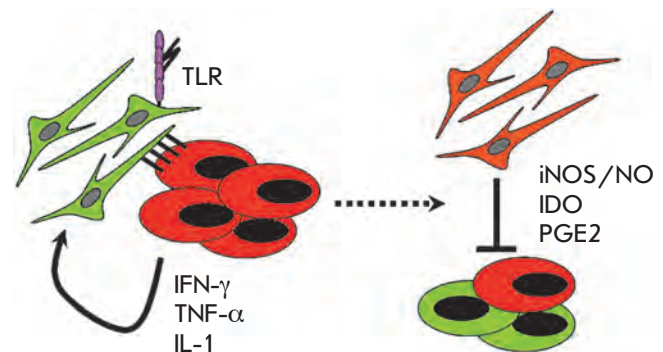


Рис. 2. Схематическое представление ключевых факторов, стимулирующих иммуносупрессорные свойства МСК (слева), и растворимых медиаторов негативного влияния МСК на функцию Т-клеток (справа).

нов разных типов (IgA, IgM, IgG), а также снижение экспрессии рецепторов хемокинов (CXCR4, CXCR5, CXCL12), выражающееся в угнетении хемотаксиса клеток [57, 64]. Набор факторов, секретируемых МСК, негативно влияет на продукцию антител плазматическими клетками за счет действия активных лигандов CCL2 и CCL7, которые образуются в результате активности матриксных металлопротеиназ, выделяемых МСК [65] (рис. 3).

Влияние МСК на иммунные клетки в ранних работах определяли в культуре мононуклеаров крови, активированных путем предварительной инкубации с антителами к Т-клеточному рецептору либо с неспецифическими активаторами иммунного ответа (гемагглютинин, суперантигены, LPS) [57–60]. В таких тестах Т-клетки – это самая удобная для изучения популяция клеток, так как это – наиболее многочисленная и лучше всего охарактеризованная фракция клеток иммунной системы. Именно поэтому механизм влияния МСК на Т-клетки довольно хорошо изучен. Из экспериментов по влиянию МСК на активацию и эффекторную функцию Т-клеток установлено, что иммуносупрессорные свойства присущи только МСК, которые предварительно инкубировали с активированными Т-клетками [68] (рис. 2). Более того, инкубация МСК с индивидуальными очищенными провоспалительными цитокинами, например с IFN- γ , приводит к появлению у МСК (и супернатантов культур МСК) иммуносупрессорных свойств [69–72]. Это свидетельствует о том, что цитокины стимулируют МСК, и такая «активация» лежит в основе проявления ими иммуносупрессорных свойств (рис. 2).

АКТИВАЦИЯ ИММУНОСУПРЕССОРНЫХ СВОЙСТВ МСК ТРЕБУЕТ ИХ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЦИТОКИНАМИ

Рецепция каких цитокинов необходима для проявления МСК иммуносупрессорных свойств? Ответ на этот вопрос получен при помощи блокирующих антител к различным провоспалительным цитокинам в сокультурах МСК и активированных Т-клеток [69–72]. Использование этого подхода показало, что нейтрализация IFN- γ , снижение уровня рецептора IFN- γ путем сверхэкспрессии в МСК микроРНК, интерферирующих с мРНК одной из его субъединиц, а также использование МСК из мышей с нокаутом гена рецептора IFN- γ приводит к значительному снижению способности таких модифицированных МСК угнетать активацию Т-клеток в культуре [69]. Альтернативный путь активации МСК провоспалительными цитокинами требует участия сразу нескольких белков, в частности IFN- γ , TNF- α , IL-1 β . Участие этих цитокинов подтверждено в опытах *in vitro* с использованием антител, блокирующих соответствующие

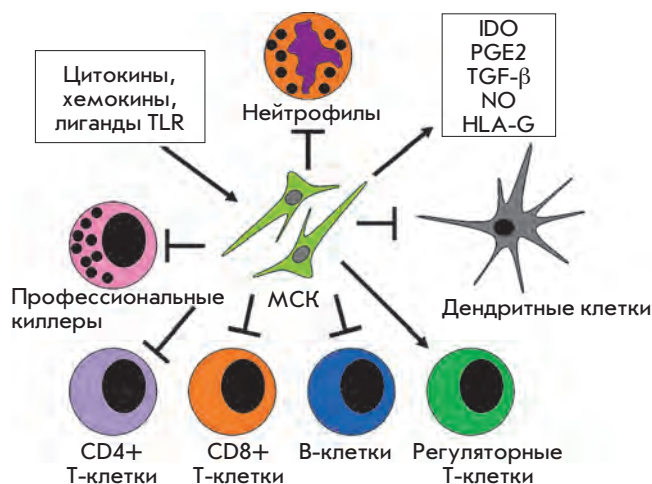


Рис. 3. Спектр клеточных мишеней иммуносупрессии МСК. В рамке слева представлены факторы – индукторы иммуносупрессии МСК, справа – основные молекулы – медиаторы супрессии. МСК вызывают апоптоз у нейтрофилов, подавляют созревание дендритных клеток и продукцию ими провоспалительных цитокинов (IFN- γ , IL-12, TNF- α), замедляют деление и дифференцировку В-клеток в плазматические клетки, снижают продукцию ими иммуноглобулинов, угнетают деление NK, CD4+ и CD8+ Т-клеток, продукцию ими цитокинов и формирование цитотоксических CD8 Т-клеток. В то же время МСК стимулируют выработку IL-10 дендритными и регуляторными Т-клетками и способствуют экспансии Т-клеток. Стрелками показано положительное влияние МСК на функцию клеток, стрелками с тупыми концами – негативное влияние.

цитокины. Любопытно, что при этом блокада одного или попарно двух разных цитокинов из этой тройки незначительно снижала иммуносупрессорные свойства МСК в культуре [69]. Только одновременная блокада всех трех факторов приводила к выраженному физиологическому эффекту.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ КЛЕТКАМИ МСК

Изучение различий на молекулярном уровне между «обычными» и активированными МСК показало, что под действием цитокинов изменяется экспрессия целого ряда генов, которые могут отвечать за механизмы супрессии (рис. 2). В частности, под действием провоспалительных цитокинов происходит увеличение уровня индоламин-2,3-дезоксигеназы (IDO) в МСК [73]. Ранее было показано, что IDO является негативным регулятором функции Т-клеток. Считается, что секретируемая форма этого фермента снижает концентрацию свободного триптофана, большие количества которого необходимы быстро делящимся

активированным Т-клеткам [74]. Более того, катаболит триптофана – кинуренин, который является продуктом ферментативной активности IDO, тоже подавляет активацию Т-клеток [74]. Эксперименты с использованием синтетического ингибитора IDO или МСК из мышей с дефицитом IDO подтверждают важную роль этого белка в иммуносупрессии МСК [69, 74, 75].

Альтернативный путь активации МСК одновременно IFN- γ , TNF- α и IL-1 β также установлен на молекулярном уровне и главным образом заключается в значительном увеличении экспрессии гена *iNOS* (индуцибельной NO-синтазы) МСК. *iNOS* – это фермент, который отвечает за продукцию клетками NO в стрессовых условиях. Уровень транскрипции гена *iNOS* в нормальных условиях крайне низок. Известно, что в целом ряде клеток иммунной системы уровень *iNOS* значительно возрастает под действием цитокинов и других стрессовых воздействий [76]. Увеличение уровня *iNOS* МСК при активации может свидетельствовать об увеличении продукции NO этими клетками. Действие NO на стимулированные Т-клетки, согласно существующим данным, заключается в подавлении их деления, секреции цитокинов, а также, по-видимому, увеличении уровня гибели клеток. Использование ингибиторов, а также МСК, дефицитных по *iNOS*, показало, что активность *iNOS* или NO необходима для проявления иммуносупрессорных свойств МСК [76].

Интересно, что различные механизмы иммуносупрессии, согласно полученным недавно данным, по всей видимости, могут зависеть от наличия/отсутствия контактов между клетками. В случае контактного сокультивирования МСК и активированных Т-клеток наблюдали преимущественно увеличение в системе уровня TNF- α , но не IFN- γ . Соответственно иммуносупрессия при этом преимущественно зависела от *iNOS*. С другой стороны, использование бесконтактной модели приводило к реализации альтернативной программы, требующей выработки IFN- γ и соответственно использующей для иммуносупрессии продукцию IDO [69].

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОСУПРЕССИИ МСК

Механизмы, с помощью которых МСК нейтрализуют активацию клеток иммунной системы, не ограничиваются только секрецией IDO и NO. Показано, что МСК постоянно экспрессируют индуцируемый фермент – циклооксигеназу-2 (COX-2), который отвечает за синтез простагландина E2 (PGE2) из арахидоновой кислоты. PGE2 – это липид, негативно влияющий на активацию Т-клеток. Инкубация МСК в присутствии лимфоцитов крови приводит к суще-

ственному увеличению уровня PGE2 в культуре [59, 75, 77, 78]. Это может свидетельствовать о взаимодействии МСК и Т-клеток, которое приводит к увеличению синтеза иммуносупрессорных молекул. Инкубация МСК в присутствии IFN- γ и TNF- α приводит к всплеску уровня экспрессии COX-2 и секреции PGE2, свидетельствуя о том, что уровень воспаления может контролировать выработку этой регуляторной молекулы [77]. Добавление в смешанную культуру Т-клеток и МСК ингибиторов PGE2 значительно снизило уровень иммуносупрессии [77, 78].

Показано, что МСК при инкубации с лимфоцитами или провоспалительными цитокинами секретируют повышенный уровень IL-10 и TGF- β – противовоспалительных цитокинов, которые негативно влияют на активацию и деление Т-клеток. Блокирующие антитела к этим факторам частично снимают иммуносупрессорный эффект, наблюдаемый в отсутствие антител *in vitro* [79]. Считается, что выработка IL-10 и TGF- β МСК при активации не столько прямо влияет на Т-клетки, сколько ускоряет экспансию регуляторных Т-клеток, минорной популяции CD4-лимфоцитов, мощных негативных регуляторов иммунного ответа [80].

Еще один растворимый фактор, возможно, участвующий в регуляции иммунного ответа МСК – это неклассическая молекула антигена комплекса гистосовместимости I класса, G5 (HLA-G5). Молекулы этого типа играют важную роль в установлении иммунологической толерантности при беременности. МСК секретируют растворимую изоформу HLA-G5 в условиях контактов между МСК и Т-клетками в смешанных гетерологичных культурах. HLA-G5 супрессирует пролиферацию Т-клеток и угнетает цитотоксические свойства NK-клеток, одновременно ускоряя деление регуляторных Т-клеток [65].

Недавно было установлено, что МСК экспрессируют набор Толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors – TLR), которые отвечают за узнавание молекулярных мотивов различных патогенов и активацию клеток врожденного иммунитета [81]. МСК в культуре экспрессируют целый набор TLR (TLR1–TLR8) [82]. Стимуляция МСК путем инкубации с лигандами различных TLR (таких, как, например, LPS) приводит к транслокации фактора транскрипции NF- κ B в ядро и активации программы, которая в подавляющем большинстве случаев одновременно повышает иммуносупрессорные свойства МСК и увеличивает секрецию IL-6 [83, 84]. Увеличение активности МСК при лигировании TLR несложно объяснить тем, что пути передачи сигнала от рецептора IFN- γ и TLR пересекаются [83, 84]. Таким образом, эффект от лигирования TLR может приводить (подобно IFN- γ) к увеличению секреции PGE2 и IDO [81].

Приведенные выше механизмы активации МСК и иммуносупрессии опосредованы растворимыми факторами. В то же время описаны механизмы подавления иммунного ответа МСК, которые зависят от межклеточных контактов. Один из наиболее изученных примеров – это молекулы клеточной адгезии ICAM-1 и VCAM-1 [85, 86], уровень которых на поверхности МСК значительно возрастает в присутствии факторов воспаления. Эти молекулы отвечают за направленную миграцию лейкоцитов и их прохождение через стенки кровеносных сосудов. Показано, что увеличение экспрессии ICAM-1 и VCAM-1 МСК – это один из возможных механизмов иммуносупрессии, так как использование блокирующих антител к этим молекулам снижало уровень иммуносупрессии МСК в культуре [85]. Результаты экспериментов в культуре подтверждаются данными опытов *in vivo*, в которых для иммуносупрессии использовали МСК с нокаутом ICAM-1 и VCAM-1 [85]. К сожалению, результаты этих экспериментов нельзя интерпретировать однозначно, так как неспецифический вклад генетического дефекта в клеточную подвижность невозможно отделить от непосредственного вклада ICAM-1 и VCAM-1 в подавление функции Т-клеток.

ИММУНОСУПРЕССИЯ МСК *IN VIVO*

Способность МСК супрессировать иммунный ответ в контексте всего организма *in vivo* впервые обнаружили в экспериментах по пересадке кожи у обезьян. Введение МСК замедляло развитие иммунологической реакции на трансплантат [68]. Кроме того, оказалось, что МСК можно использовать при тяжелых случаях реакции GVHD (реакция трансплантат против хозяина). Введение МСК мышам, у которых наблюдалось развитие летальной реакции GVHD после пересадки костного мозга, увеличивало их выживаемость [87, 88]. Механизмы, отвечающие за улучшение клинической картины, не были определены достоверно и были частично охарактеризованы в дополнительных опытах с использованием животных. Так, показано, что Т-клетки с дефицитом IFN- γ невосприимчивы к супрессии со стороны МСК в модели GVHD. В этой системе преактивация МСК IFN- γ приводила к пятикратному увеличению иммуносупрессорных свойств МСК по сравнению с контрольными клетками [87–90].

Иммуносупрессорный эффект МСК было бы заманчиво использовать при таких аутоиммунных состояниях человека, как сахарный диабет, артрит, рассеянный склероз, системная красная волчанка. В мышинной модели экспериментального аутоиммунного энцефалита (ЕАЕ – experimental autoimmune encephalitis), аналога рассеянного склероза, системное введение МСК заболевшим мышам предот-

вращало развитие воспалительных инфильтратов (Т-клеток, В-клеток и макрофагов) и процесс демиелинизации в ЦНС, а также снижало ответ Т-клеток на MOG (пептиды, производные миеллина) [91]. Среда, в которой растили МСК, в условиях ЕАЕ угнетала активацию CD4⁺ Т-клеток, снижая фосфорилирование в них белка STAT-3 [92]. Инфильтрация CD4 Т-клеток в спинной мозг мышей, получивших МСК, была снижена, как и уровень провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-17 [91]. В другой работе перенос МСК из мышей линии Balb/c реципиентам линии B57BL/6 с выраженными симптомами ЕАЕ приводил к смягчению симптомов, которое выражалось в снижении инфильтрации иммунных клеток в ЦНС и снижении уровня цитокинов IFN- γ и IL-17 в крови [93].

В мышинной модели индуцированного коллагеном артрита системное введение МСК из жировой ткани человека значительно снижало вероятность развития и тяжесть заболевания. При этом уровень воспаления и иммунного ответа по Th1-типу был значительно снижен. Инъекция МСК приводила к подавлению экспансии антиген-специфических клеток, синтезирующих IFN- γ и IL-17 [94]. Наряду с этим наблюдали увеличение секреции противовоспалительного цитокина IL-10 в лимфатических узлах, прилегающих к воспаленным суставам, и увеличение числа регуляторных Т-клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ [94]. *In vitro* МСК подавляли активацию и деление Т-клеток, полученных от больных ревматоидным артритом, в ответ на коллаген, усиливая секрецию Т-клетками IL-10 [95]. Более того, МСК стимулировали образование регуляторных Т-клеток, способных супрессировать ответ Т-клеток на коллаген и снижать уровень ферментов, разрушающих межклеточный матрикс, в синовиальных клетках [95]. Однако результаты независимого исследования, выполненного с использованием специфической субпопуляции МСК, экспрессирующей маркер Flk-1, показали, что МСК, напротив, способны усиливать проявления артрита, повышая секрецию IL-6 и дифференцировку по типу Th17 [96].

В модели острой почечной недостаточности введение МСК восстанавливало функцию почек, снижая уровень провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) [97]. Участие МСК в контроле развития фиброза изучено в модели хронической почечной недостаточности у крыс. Наряду со снижением уровня IL-6 и TNF- α введение МСК приводило к уменьшению фиброзных изменений и восстановлению функции почек. Кроме того, отмечали увеличение уровня противовоспалительных цитокинов [98]. В модели экспериментального фиброза легких МСК снижали уровень легочного воспаления, вероятно, за счет секреции антагониста рецептора IL-1 [99].

При аутоиммунном диабете типа 1 аллогенный перенос МСК предиабетическим мышам NOD замедлял развитие болезни, способствуя усилению иммунного ответа типа 2 [72, 99, 100]. Предотвращение разрушения β -клеток и последующего развития диабета достигалось при однократном внутривенном введении МСК, причем этот эффект можно связать с индукцией регуляторных Т-клеток [99, 100]. МСК из костного мозга, размноженные в культуре, при введении крысам с индуцированным стрептозотоцином повреждением β -клеток мигрировали в поджелудочную железу, увеличивали уровень секреции инсулина и способствовали нормализации уровня сахара в крови [101]. Более того, отмечено увеличение уровня PDX-1 и инсулина в островках Лангерганса, что свидетельствует об активации β -клеток у мышей, получавших МСК [101].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, хочется отметить, что в настоящее время получены обнадеживающие данные, касающиеся перспектив использования МСК и препаратов, основанных на секретируемых ими факторах, в терапии аутоиммунных заболеваний и регенера-

тивной медицине. Приведенные материалы убедительно доказывают, что иммуносупрессорный потенциал МСК можно усилить путем инкубации этих клеток с факторами воспаления и цитокинами. Кроме того, существует возможность получения генетически модифицированных МСК с улучшенными иммуносупрессорными характеристиками. Тем не менее следует помнить, что невозможность строгого контроля состояния МСК в культуре и недостаточно доказанная генетическая стабильность этих клеток сдерживают внедрение клеточных технологий на основе МСК. Еще один немаловажный фактор – накопление данных о способности МСК поддерживать и ускорять рост опухолей за счет секреции факторов, положительно влияющих на регенерацию тканей [102]. ●

Работа выполнена в рамках Госконтракта (№ 16.512.11.2088) «Исследование регуляции взаимодействий мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани и иммунных клеток in vitro с целью предотвращения аутоиммунных заболеваний» Министерства образования и науки Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Luria E.A., Panasyuk A.F., Friedenstein A.Y. // Transfusion. 1971. V. 11. P. 345–349.
- Kassem M. // Cloning Stem Cells. 2004. V. 6. P. 369–374.
- da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. // J. Cell Sci. 2006. V. 119. P. 2204–2213.
- Kastrinaki M.C., Andreakou I., Charbord P., Papadaki H.A. // Tissue Eng. Part C Methods. 2008. V. 14. P. 333–339.
- Basciano L., Nemos C., Foliguet B., de Isla N., de Carvalho M., Tran N., Dalloul A. // BMC Cell Biol. 2011. V. 30. P. 12.
- Zimmermann S., Voss M., Kaiser S., Kapp U., Waller C.F., Martens U.M. // Leukemia. 2003. V. 17. P. 1146–1149.
- Tsai C.C., Chen C.L., Liu H.C., Lee Y.T., Wang H.W., Hou L.T., Hung S.C. // J. Biomed. Sci. 2010. V. 17. P. 74.
- Haniffa M.A., Collin M.P., Buckley C.D., Dazzi F. // Haematologica. 2009. V. 94. P. 258–263.
- Feng J., Mantesso A., De Bari C., Nishiyama A., Sharpe P.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 6503–6508.
- Augello A., Kurth T.B., De Bari C. // Eur. Cell Mater. 2010. V. 20. P. 121–133.
- Jang K.S., Lee K.S., Yang S.H., Jeun S.S. // J. Korean Neurosurg. Soc. 2010. V. 48. P. 391–398.
- Zimmermann C.E., Gierloff M., Hedderich J., Acil Y., Wiltfang J., Terheyden H. // Tissue Eng. Part A. 2011. V. 17. P. 1147–1156.
- Wei N., Gong P., Liao D., Yang X., Li X., Liu Y., Yuan Q., Tan Z. // Cytotherapy. 2010. V. 12. P. 514–521.
- Westrich J., Yaeger P., He C., Stewart J., Chen R., Selezniuk G., Larson S., Wentworth B., O'Callaghan M., Wadsworth S., et al. // Cell Transplant. 2010. V. 19. P. 937–948.
- Sordi V. // Transplantation. 2009. V. 15. (9 Suppl). P. 42–45.
- Lau T.T., Wang D.A. // Expert. Opin. Biol. Ther. 2011. V. 11. P. 189–197.
- Ponte A.L., Marais E., Gallay N., Langonné A., Delorme B., Héroult O., Charbord P., Domenech J. // Stem Cells. 2007. V. 25. P. 1737–1745.
- Dwyer R.M., Potter-Beirne S.M., Harrington K.A., Lowery A.J., Hennessy E., Murphy J.M., Barry F.P., O'Brien T., Kerin M.J. // Clin. Cancer Res. 2007. V. 13. P. 5020–5027.
- Wynn R.F., Hart C.A., Corradi-Perini C., O'Neill L., Evans C.A., Wraith J.E., Fairbairn L.J., Bellantuono I. // Blood. 2004. V. 104. P. 2643–2645.
- Bhakta S., Hong P., Koc O. // Cardiovasc. Revasc. Med. 2006. V. 7. P. 19–24.
- Theiss H.D., Vallaster M., Rischpler C., Krieg L., Zaruba M.M., Brunner S., Vanchev Y., Fischer R., Gröbner M., Huber B., et al. // Stem Cell Res. 2011. V. 7. P. 244–255.
- Mohty M., Ho A.D. // Exp. Hematol. 2011. V. 39. P. 723–729.
- Meyerrose T., Olson S., Pontow S., Kalomoiris S., Jung Y., Annett G., Bauer G., Nolte J.A. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2010. V. 62. P. 1167–1174.
- Schneider R.K., Anraths J., Kramann R., Bornemann J., Bovi M., Knüchel R., Neuss S. // Biomaterials. 2010. V. 31. P. 7948–7959.
- Kasper G., Glaeser J.D., Geissler S., Ode A., Tuischer J., Matziolis G., Perka C., Duda G.N. // Stem Cells. 2007. V. 25. P. 1985–1994.
- Tapp H., Deepe R., Ingram J.A., Hanley E.N. Jr., Gruber H.E. // Arthritis Res. Ther. 2008. V. 10. P. R89.
- Joo S.Y., Cho K.A., Jung Y.J., Kim H.S., Park S.Y., Choi Y.B., Hong K.M., Woo S.Y., Seoh J.Y., Cho S.J., et al. // Cytotherapy. 2010. V. 12. P. 361–370.

28. Breitbart E.A., Meade S., Azad V., Yeh S., Al-Zube L., Lee Y.S., Benevenia J., Arinze T.L., Lin S.S. // *J. Orthop. Res.* 2010. V. 28. P. 942–949.
29. Battiwalla M., Hematti P. // *Cytotherapy.* 2009. V. 11. P. 503–515.
30. Park K.S., Kim Y.S., Kim J.H., Choi B., Kim S.H., Tan A.H., Lee M.S., Lee M.K., Kwon C.H., Joh J.W., et al. // *Transplantation.* 2010. V. 89. P. 509–517.
31. Kumar S., Wan C., Ramaswamy G., Clemens T.L., Ponnazhagan S. // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. P. 1026–1034.
32. Tang J., Wang J., Zheng F., Kong X., Guo L., Yang J., Zhang L., Huang Y. // *Mol. Cell. Biochem.* 2010. V. 339. P. 107–118.
33. Trzaska K.A., King C.C., Li K.Y., Kuzhikandathil E.V., Nowycky M.C., Ye J.H., Rameshwar P. // *J. Neurochem.* 2009. V. 110. P. 1058–1069.
34. Yang J., Wu H., Hu N., Gu X., Ding F. // *Neurochem. Res.* 2009. V. 34. P. 1685–1694.
35. Neuhuber B., Timothy Himes B., Shumsky J.S., Gallo G., Fischer I. // *Brain Res.* 2005. V. 1035. P. 73–85.
36. Burastero G., Scarfi S., Ferraris C., Fresia C., Sessarego N., Fruscione F., Monetti F., Scarfó F., Schupbach P., Podestà M., et al. // *Bone.* 2010. V. 47. P. 117–126.
37. Granero-Moltó F., Weis J.A., Miga M.I., Landis B., Myers T.J., O'Rear L., Longobardi L., Jansen E.D., Mortlock D.P., Spagnoli A. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. P. 1887–1898.
38. Osyczka A.M., Leboy P.S. // *Endocrinology.* 2005. V. 146. P. 3428–3437.
39. Ioannou A., Dalle Lucca J., Tsokos G.C. // *Clin. Immunol.* 2011. V. 141. P. 3–14.
40. Maskrey B.H., Megson I.L., Whitfield P.D., Rossi A.G. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. V. 31. P. 1001–1006.
41. Ratajczak M.Z., Kim C.H., Wojakowski W., Janowska-Wieczorek A., Kucia M., Ratajczak J. // *Leukemia.* 2010. V. 24. P. 1667–1675.
42. Iadecola C., Anrather J. // *Nat. Med.* 2011. V. 17. P. 796–808.
43. Witte E., Witte K., Warszawska K., Sabat R., Wolk K. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010. V. 21. P. 365–379.
44. Rouse B.T., Sehrawat S. // *Nat. Rev. Immunol.* 2010. V. 10. P. 514–526.
45. Konkel J.E., Chen W. // *Trends Mol. Med.* 2011. V. 17. P. 668–676.
46. Hoyne G.F. // *Clin. Dev. Immunol.* 2011. V. 2011. P. 2949–2968.
47. Nurieva R.I., Liu X., Dong C. // *Immunol. Rev.* 2011. V. 241. P. 133–144.
48. Torchinsky M.B., Garaude J., Blander J.M. // *Curr. Opin. Immunol.* 2010. V. 22. P. 55–62.
49. Lei B., Hitomi H., Mori T., Nagai Y., Deguchi K., Mori H., Masaki T., Nakano D., Kobori H., Kitaura Y., et al. // *J. Pharmacol. Sci.* 2011. V. 117. P. 98–105.
50. Gong K., Chen Y.F., Li P., Lucas J.A., Hage F.G., Yang Q., Nozell S.E., Oparil S., Xing D. // *J. Hypertens.* 2011. V. 29. P. 1810–1819.
51. Umemoto E., Hayasaka H., Bai Z., Cai L., Yonekura S., Peng X., Takeda A., Tohya K., Miyasaka M. // *Crit. Rev. Immunol.* 2011. V. 31. P. 147–169.
52. Marigo I., Dazzi F. // *Semin. Immunopathol.* 2011. V. 33. P. 593–602.
53. Devine S.M., Cobbs C., Jennings M., Bartholomew A., Hoffman R. // *Blood.* 2003. V. 101. P. 2999–3001.
54. Krampera M., Glennie S., Dyson J., Scott D., Laylor R., Simpson E., Dazzi F. // *Blood.* 2003. V. 101. P. 3722–3729.
55. Liu H., Kemeny D.M., Heng B.C., Ouyang H.W., Melendez A.J., Cao T. // *J. Immunol.* 2006. V. 176. P. 2864–2871.
56. Romieu-Mourez R., François M., Boivin M.N., Stagg J., Galipeau J. // *J. Immunol.* 2007. V. 179. P. 1549–1558.
57. Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G.L., Pistoia V., et al. // *Blood.* 2006. V. 107. P. 367–372.
58. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanese M., Longoni P.D., Matteucci P., Grisanti S., Gianni A.M. // *Blood.* 2002. V. 99. P. 3838–3843.
59. Aggarwal S., Pittenger M.F. // *Blood.* 2005. V. 105. P. 1815–1822.
60. Zhang W., Ge W., Li C., You S., Liao L., Han Q., Deng W., Zhao R.C. // *Stem Cells Dev.* 2004. V. 13. P. 263–271.
61. Le Blanc K., Rasmuson I., Götherström C., Seidel C., Sundberg B., Sundin M., Rosendahl K., Tammik C., Ringdén O. // *Scand. J. Immunol.* 2004. V. 60. P. 307–315.
62. Nauta A.J., Kruisselbrink A.B., Lurvink E., Willemze R., Fibbe W.E. // *J. Immunol.* 2006. V. 177. P. 2080–2087.
63. Jiang X.X., Zhang Y., Liu B., Zhang S.X., Wu Y., Yu X.D., Mao N. // *Blood.* 2005. V. 105. P. 4120–4126.
64. Sotiropoulou P.A., Perez S.A., Gritzapis A.D., Baxevas C.N., Papamichail M. // *Stem Cells.* 2006. V. 24. P. 74–85.
65. Selmani Z., Naji A., Zidi I., Favier B., Gaiffe E., Obert L., Borg C., Saas P., Tiberghien P., Rouas-Freiss N., et al. // *Stem Cells.* 2008. V. 26. P. 212–222.
66. Rasmuson I., Le Blanc K., Sundberg B., Ringdén O. // *Scand. J. Immunol.* 2007. V. 65. P. 336–343.
67. Rafei M., Hsieh J., Fortier S., Li M., Yuan S., Birman E., Forner K., Boivin M.N., Doody K., Tremblay M., et al. // *Blood.* 2008. V. 112. P. 4991–4998.
68. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M., Ferrer K., McIntosh K., Patil S., Hardy W., Devine S., Ucker D., Deans R., et al. // *Exp. Hematol.* 2002. V. 30. P. 42–48.
69. Hemeda H., Jakob M., Ludwig A.K., Giebel B., Lang S., Brandau S. // *Stem Cells Dev.* 2010. V. 19. P. 693–706.
70. Ryan J.M., Barry F., Murphy J.M., Mahon B.P. // *Clin. Exp. Immunol.* 2007. V. 149. P. 353–363.
71. Du Y.Y., Zhou S.H., Zhou T., Su H., Pan H.W., Du W.H., Liu B., Liu Q.M. // *Cytotherapy.* 2008. V. 10. P. 469–478.
72. Ortiz L.A., Dutreil M., Fattman C., Pandey A.C., Torres G., Go K., Phinney D.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 11002–11007.
73. Meisel R., Zibert A., Laryea M., Göbel U., Däubener W., Dilloo D. // *Blood.* 2004. V. 103. P. 4619–4621.
74. Chen W. // *Nat. Immunol.* 2011. V. 12. P. 809–811.
75. Kang J.W., Kang K.S., Koo H.C., Park J.R., Choi E.W., Park Y.H. // *Stem Cells Dev.* 2008. V. 17. P. 681–693.
76. Ren G., Zhang L., Zhao X., Xu G., Zhang Y., Roberts A.I., Zhao R.C., Shi Y. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 2. P. 141–150.
77. Chen K., Wang D., Du W.T., Han Z.B., Ren H., Chi Y., Yang S.G., Zhu D., Bayard F., Han Z.C. // *Clin. Immunol.* 2010. V. 135. P. 448–458.
78. Spaggiari G.M., Abdelrazik H., Becchetti F., Moretta L. // *Blood.* 2009. V. 113. P. 6576–6583.
79. Nasef A., Chapel A., Mazurier C., Bouchet S., Lopez M., Mathieu N., Sensebe L., Zhang Y., Gorin N.C., Thierry D., et al. // *Gene Expr.* 2007. V. 13. P. 217–226.
80. Di Ianni M., Del Papa B., De Ianni M., Moretti L., Bonifacio E., Cecchini D., Sportoletti P., Falzetti F., Tabilio A. // *Exp. Hematol.* 2008. V. 36. P. 309–318.
81. Pevsner-Fischer M., Morad V., Cohen-Sfady M., Rousso-Noori L., Zanin-Zhorov A., Cohen S., Cohen I.R., Zipori D. // *Blood.* 2007. V. 109. P. 1422–1432.
82. Raicevic G., Najar M., Stamatopoulos B., De Bruyn C., Meuleman N., Bron D., Toungouz M., Lagneaux L. // *Cell. Immunol.* 2011. V. 270. P. 207–216.
83. Lei J., Wang Z., Hui D., Yu W., Zhou D., Xia W., Chen C., Zhang Q., Wang Z., Zhang Q., et al. // *Cell. Immunol.* 2011. V. 271. P. 147–156.

84. Raicevic G., Rouas R., Najar M., Stordeur P., Boufker H.I., Bron D., Martiat P., Goldman M., Nevešignsky M.T., Lagneaux L. // *Hum. Immunol.* 2010. V. 71. P. 235–244.
85. Ren G., Zhao X., Zhang L., Zhang J., L'Huillier A., Ling W., Roberts A.I., Le A.D., Shi S., Shao C., et al. // *J. Immunol.* 2010. V. 184. P. 2321–2328.
86. Najar M., Raicevic G., Id Boufker H., Stamatopoulos B., De Bruyn C., Meuleman N., Bron D., Toungouz M., Lagneaux L. // *Exp. Hematol.* 2010. V. 38. P. 922–932.
87. Le Blanc K., Rasmuson I., Sundberg B., Götherström C., Hassan M., Uzunel M., Ringdén O. // *Lancet.* 2004. V. 363. P. 1439–1441.
88. Le Blanc K., Frassoni F., Ball L., Locatelli F., Roelofs H., Lewis I., Lanino E., Sundberg B., Bernardo M.E., Remberger M., et al. // *Lancet.* 2008. V. 371. P. 1579–1586.
89. Yañez R., Lamana M.L., García-Castro J., Colmenero I., Ramírez M., Bueren J.A. // *Stem Cells.* 2006. V. 24. P. 2582–2591.
90. Polchert D., Sobinsky J., Douglas G., Kidd M., Moadsiri A., Reina E., Genrich K., Mehrotra S., Setty S., Smith B., et al. // *Eur. J. Immunol.* 2008. V. 38. P. 1745–1755.
91. Zappia E., Casazza S., Pedemonte E., Benvenuto F., Bonanni I., Gerdoni E., Giunti D., Ceravolo A., Cazzanti F., Frassoni F., et al. // *Blood.* 2005. V. 106. P. 1755–1761.
92. Rafei M., Campeau P.M., Aguilar-Mahecha A., Buchanan M., Williams P., Birman E., Yuan S., Young Y.K., Boivin M.N., Forner K., et al. // *J. Immunol.* 2009. V. 182. P. 5994–6002.
93. Rafei M., Birman E., Forner K., Galipeau J. // *Mol. Ther.* 2009. V. 17. P. 1799–1803.
94. González M.A., Gonzalez-Rey E., Rico L., Büscher D., Delgado M. // *Arthritis Rheum.* 2009. V. 60. P. 1006–1019.
95. Gonzalez-Rey E., Gonzalez M.A., Varela N., O'Valle F., Hernandez-Cortes P., Rico L., Büscher D., Delgado M. // *Ann. Rheum. Dis.* 2010. V. 69. P. 241–248.
96. Chen B., Hu J., Liao L., Sun Z., Han Q., Song Z., Zhao R.C. // *Clin. Exp. Immunol.* 2010. V. 159. P. 292–302.
97. Semedo P., Palasio C.G., Oliveira C.D., Feitoza C.Q., Goncalves G.M., Cenedeze M.A., Wang P.M., Teixeira V.P., Reis M.A., Pacheco-Silva A., et al. // *Int. Immunopharmacol.* 2009. V. 9. P. 677–682.
98. Semedo P., Correa-Costa M., Antonio Cenedeze M., Maria Avancini Costa Malheiros D., Antonia dos Reis M., Shimizu M.H., Seguro A.C., Pacheco-Silva A., Saraiva Camara N.O. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. P. 3063–3073.
99. Fiorina P., Jurewicz M., Augello A., Vergani A., Dada S., La Rosa S., Selig M., Godwin J., Law K., Placidi C., et al. // *J. Immunol.* 2009. V. 183. P. 993–1004.
100. Madec A.M., Mallone R., Afonso G., Abou Mrad E., Mesnier A., Eljaafari A., Thivolet C. // *Diabetologia.* 2009. V. 52. P. 1391–1399.
101. Boumaza I., Srinivasan S., Witt W.T., Feghali-Bostwick C., Dai Y., Garcia-Ocana A., Feili-Hariri M. // *J. Autoimmun.* 2009. V. 32. P. 33–42.
102. Tsukamoto S., Honoki K., Fujii H., Tohma Y., Kido A., Mori T., Tsujiuchi T., Tanaka Y. // *Int. J. Oncol.* 2012. V. 40. P. 163–169.

УДК 577.21

Аналоги малых ядрышковых С/D-бокс-РНК человека как регуляторы альтернативного сплайсинга пре-мРНК-мишени

Г. А. Степанов^{1*}, Д. В. Семенов¹, Е. В. Кулигина¹, О. А. Коваль¹, И. В. Рабинов¹, Ю. Я. Кит², В. А. Рихтер¹

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

²Институт биологии клетки НАН Украины, 79005, Львов, ул. Драгоманова, 14/16

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

Поступила в редакцию 24.10.2011 г.

РЕФЕРАТ Малые ядрышковые РНК (мяоРНК) играют важную роль в биогенезе эукариотических рибосомных РНК (рРНК). С/D-бокс-мяоРНК направляют сайт-специфичное 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК и малых ядерных РНК (мяРНК). Некоторые природные С/D-бокс-РНК, а также их фрагменты участвуют в регуляции посттранскрипционной модификации и альтернативного сплайсинга пре-мРНК. В представленной работе сконструированы и синтезированы искусственные аналоги U24 С/D-бокс-мяоРНК, направленные на нуклеотиды 28S и 18S рРНК человека, пре-мРНК и зрелой мРНК белка теплового шока hsc70. Установлено, что в клетках линии MCF-7 человека, трансфицированных синтетическими аналогами С/D-бокс-РНК в комплексе с липофектаминол, аналоги мяоРНК проникают внутрь клеток и накапливаются в цитоплазме и ядре. Трансфекция клеток человека синтетическими аналогами С/D-бокс-РНК, несущих область узнавания, комплементарную пре-мРНК белка hsc70, вызывает частичное нарушение сплайсинга мРНК-мишени. Трансфекция аналогами С/D-бокс-РНК, направленными на нуклеотиды 18S и 28S рРНК, ключевых для функционирования рибосом, приводит к снижению жизнеспособности клеток MCF-7.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА малые ядрышковые С/D-бокс-РНК, посттранскрипционная модификация РНК, альтернативный сплайсинг пре-мРНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ рРНК – рибосомные РНК; мяоРНК – малые ядрышковые РНК; мяРНК – малые ядерные РНК; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; офВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; МТТ – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия; FAM – карбоксифлуоресцеин.

ВВЕДЕНИЕ

Класс малых ядрышковых РНК (мяоРНК) представлен двумя основными семействами – С/D-бокс-РНК и Н/АСА-бокс-РНК. В составе рибонуклеопротеидных комплексов эти РНК, выполняя функцию узнающего и направляющего элемента, участвуют в модификации нуклеотидов эукариотических рибосомных РНК. РНК, относящиеся к семейству С/D-бокс-РНК, направляют 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК. С/D-бокс-РНК содержат консервативные структурные элементы – CUGA (D-бокс) и RUGAUGA (С-бокс) вблизи 5'- и 3'-конца соответственно. В С/D-бокс-РНК выделяют область узнавания мишени – последовательность, комплементарную участку РНК-мишени. Некоторые РНК содержат две области узнавания и две пары С/D-боксов (С, D, С', D') [1].

В работе Cavaille J. и соавт. [2] показано, что если РНК содержит структурные элементы, определяющие ее принадлежность к семейству С/D-бокс-РНК, то для определения мишени метилирования достаточно соответствующей области С/D-бокс-мяоРНК, комплементарной РНК-мишени. Показана возможность направлять 2'-О-метилирование нуклеотидов РНК, не имеющих природных 2'-О-метильных групп, посредством аналогов С/D-бокс-РНК [2].

Один из основных подходов к изучению свойств С/D-бокс-РНК – создание ДНК-конструкций, экспрессирующихся внутри клетки с образованием либо коротких неприродных мяоРНК, либо фрагментов пре-мРНК, из которых в результате процессинга образуются мяоРНК, направленные на заранее заданные мишени [2]. На основе этого подхода разрабо-

таны методы направленной модификации нуклеотидов в эукариотических РНК, а также картирования функционально важных сайтов рРНК, чувствительных к *de novo* 2'-О-метилованию [3, 4]. При этом круг мишеней искусственных малых ядрышковых РНК не ограничивается рРНК и мяРНК. Все большее внимание привлекает участие мяРНК в процессе созревания мРНК. Уже известно, что С/D-боксы-РНК могут взаимодействовать и с продуктами транскрипции РНК-полимеразой I, локализованными в ядрышке, и с продуктами РНК-полимеразы II [2]. Кроме того, малая ядрышковая РНК NBII-52 (MBII-52) участвует в процессинге пре-мРНК серотонинового рецептора 5-HT_{2c}R [5, 6]. Таким образом, структура малых ядрышковых С/D-боксы-РНК представляет перспективную основу для разработки средств направленной регуляции экспрессии генов в клетках человека.

В данной работе изучено влияние синтетических аналогов природных С/D-боксы-РНК на сплайсинг пре-мРНК-мишени и процессинг 18S и 28S рРНК клеток человека. Получены аналоги U24 С/D-боксы-РНК человека, направленные на пре-мРНК белка теплового шока hsc70 и рРНК человека. Показано, что трансфекция линии клеток MCF-7 – аденокарциномы молочной железы человека, синтетическими аналогами приводит к частичному нарушению сплайсинга – исключению одного из экзонов из пре-мРНК-мишени. Установлено, что трансфекция клеток MCF-7 синтетическими аналогами С/D-боксы-РНК, направленными на рРНК, вызывает снижение жизнеспособности клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение искусственных С/D-боксы-РНК

Синтетические аналоги С/D-боксы-РНК получали с помощью транскрипции *in vitro* ДНК-матриц, полученных методом ПЦР, с использованием РНК-полимеразы фага T7 («Fermentas», Литва).

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

Клетки MCF-7 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, ИИЦ РАН, Санкт-Петербург) культивировали в среде IMDM с 10 мМ L-глутамина и 40 мкг/мл гентамицина в присутствии 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота при 37°C. Синтетические аналоги С/D-боксы-РНК преинкубировали с липофектаминол (Lipofectamine Reagent, «Invitrogen», США) согласно протоколу производителя и добавляли в культуральную среду. После инкубации клеток MCF-7 в течение 18 ч выделяли суммарную РНК с помощью Trizol Reagent

(«Invitrogen», США) согласно протоколу производителя.

Выделение цитоплазматической и ядерной фракций лизата клеток MCF-7

По завершении инкубации клетки MCF-7 охлаждали на льду. Среду отбирали, клетки промывали двумя сменами фосфатно-солевого буфера (PBS) и лизировали на льду в течение 10 мин (0.5% Тритон X-100 в буфере А, содержащем 150 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl pH 7.5, 10 мМ EDTA). Лизат суспендировали и наслаивали на 10% раствор сахарозы в буфере А, центрифугировали в течение 20 мин при 600 g. Выделение РНК из супернатанта (цитоплазматическая фракция MCF-7) и осадка ядер, суспендированного в буфере А, проводили с помощью Trizol Reagent. Концентрацию РНК в препаратах определяли спектрофотометрически ($\lambda = 260$ нм) с учетом коэффициента экстинкции для РНК ($\epsilon_{260} = 25$ л/моль · см).

Анализ вариантов сплайсинга пре-мРНК гена HSPA8 методом ОТ-ПЦР

Обратную транскрипцию пре-мРНК HSPA8 и амплификацию кДНК проводили в реакционной смеси для ОТ-ПЦР «РеалБест Мастер микс ОТ» («ВекторБест», Новосибирск) с использованием праймеров hsp2.1 – 5'-ACTGAACGGTTGATCGGTGA-3' и hsp8.2 – 5'-AGATGAGCACGTTTCTTTCT-3'. Продукты анализировали в 4% полиакриламидном геле. Количество продуктов амплификации в геле оценивали с помощью программного обеспечения Gel-Pro Analyzer 3.1. Нуклеотидные последовательности определяли по методу Сэнгера с использованием флуоресцентно меченных терминаторов ДНК-полимеразы в составе смеси «BigDye 3.1» с последующим разделением ДНК на анализаторе ABI3100 «Applied Biosystems» (Межинститутский центр секвенирования ДНК СО РАН).

Получение флуоресцентно меченной С/D-боксы-РНК и анализ накопления флуоресцентно меченной РНК в клетках человека

Флуоресцентно меченную РНК получали с помощью транскрипции *in vitro* РНК-полимеразой фага T7 («Fermentas», Литва) с использованием Flu-12-UTP («Биосан», Новосибирск). РНК-транскрипт выделяли с помощью ион-парной офВЭЖХ на приборе Милихром А-02 на сорбенте ProntoSIL-120-5-C18 и колонке 2.0 × 7.5 мм. Накопление флуоресцентно меченной РНК в клетках MCF-7 анализировали с использованием флуоресцентной микроскопии (Центр коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН). С этой целью 3 × 10⁴ клеток MCF-7 высаживали на пред-

метное стекло камеры Culture Slide («BD Falcon», США), через 24 ч трансфицировали флуоресцентно меченной РНК и инкубировали в течение 18 ч. После инкубации среду убрали, клетки дважды промывали PBS, препараты заключали в каплю красителя DAPI/Antifade («Millipore», США) и покрывали покровным стеклом. Препараты анализировали на микроскопе Axioskop 2 Plus («Carl Zeiss», Германия).

Анализ 2'-О-метилирования G1702 18S рРНК

2'-О-метильные группы рРНК выявляли при помощи частичного щелочного гидролиза как описано в работе [7]. Суммарную РНК клеток MCF-7 (2.5–5.0 мкг) инкубировали в растворе 50 мМ Na₂CO₃ (рН 9.0) в течение 18 мин при 90°C. Продукты гидролиза осаждали этанолом. Обратную транскрипцию проводили с использованием праймера 18.1702 – 5'-GCCGATCCGAGGGCCTCACT-3', комплементарного участку 18S рРНК 1731–1750, с использованием обратной транскриптазы MMLV («Биосан», Новосибирск). Секвенирование участка рРНК методом обратной транскрипции в присутствии ddNTP проводили согласно [8].

Анализ жизнеспособности клеток MCF-7 с помощью МТТ-теста

Для анализа влияния аналогов С/Д-боксов-РНК на жизнеспособность клетки MCF-7 культивировали в 96-луночной планшете (3 × 10⁴ клеток на лунку). Через 24 ч к культуральной среде добавляли раствор РНК (в комплексе с липофектаминоном) до концентрации 3.0, 10.0 и 70.0 нМ. Клетки MCF-7 инкубировали с РНК в течение 3 сут, после чего в среду добавляли раствор МТТ в PBS до конечной концентрации 0.5 мг/мл. Инкубировали при 37°C в течение 90 мин, среду удаляли, кристаллы МТТ-формазана растворяли в 100 мкл изопропилового спирта. Оптическую плотность раствора определяли (λ = 570 нм, контроль при λ = 620 нм) на многоканальном спектрофотометре Apollo 8 LB 912 («Berthold Technologies», Германия). Данные представляли как снижение жизнеспособности (100% – (МТТ-индекс)) по сравнению с контролем (клетки, инкубированные в тех же условиях с липофектаминоном без РНК).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние синтетических аналогов С/Д-боксов-РНК на процессинг РНК в клетках человека изучали с использованием сконструированных нами аналогов природной U24 С/Д-боксов-РНК человека. U24 РНК человека содержит последовательности CUGA и AUGAUGU (GUGAUGA) – D- и С (С')-боксы соответственно, а также две области узнавания мишеней, направляющие 2'-О-метилирование C2338

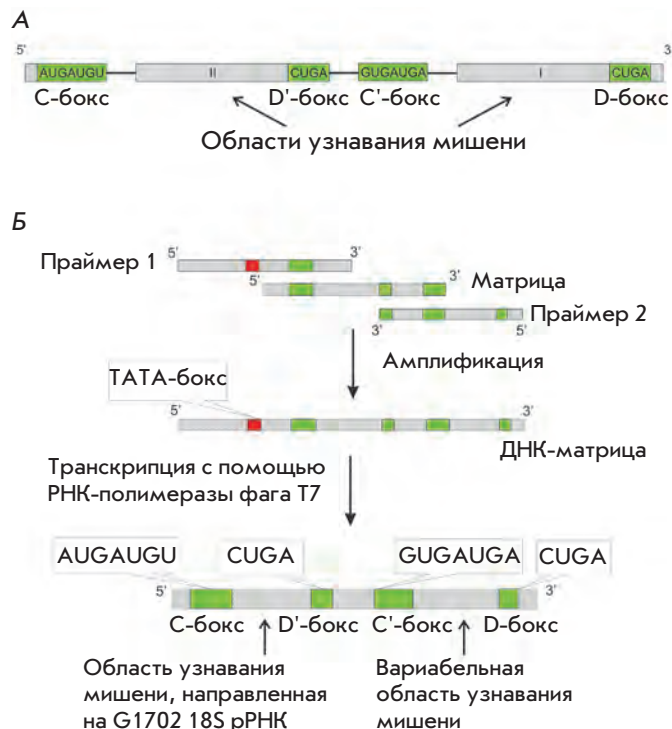


Рис. 1. Структура U24 С/Д-боксов-РНК (А) и схема синтеза аналогов С/Д-боксов-РНК (Б).

и C2352 28S рРНК (рис. 1А) [9]. Полученные аналоги содержат консервативные участки, идентичные U24 С/Д-боксов-РНК, и области, комплементарные участкам РНК-мишеней, сконструированные таким образом, чтобы целевой нуклеотид в РНК-мишени был комплементарен пятому нуклеотиду от D (D')-боксов (CUGA) аналога С/Д-боксов-РНК [2]. Все полученные РНК содержали два набора С/Д-боксов (С/Д и С'/Д') и соответственно две области узнавания (рис. 1Б).

Первая из областей узнавания (D-боксов-зависимая) была направлена на нуклеотиды пре-мРНК гена HSPA8, кодирующего белок теплового шока (hsc70). Подавление экспрессии белков, родственных hsp70, в том числе белка hsc70, вызывает гибель раковых клеток в культуре. При этом сам ген HSPA8 рассматривается в качестве перспективной мишени для ген-направленной терапии опухолей [10]. В качестве мишеней синтетических аналогов были выбраны нуклеотиды, модификация которых может отрицательно повлиять на процесс вырезания второго интрона при сплайсинге пре-мРНК: аденозин – точка разветвления при сплайсинге, донорный и акцепторный сайты сплайсинга, первый и последний нуклеотиды интрона. Вторая область узнавания (D'-боксов-зависимая) была направлена на G1702 18S рРНК

Таблица 1. Синтетические аналоги U24 C/D-бокс-РНК, направленные на нуклеотиды, критичные для сплайсинга пре-мРНК гена *HSPA8*

Обозначение	Нуклеотидная последовательность*	Нуклеотид-мишень в пре-мРНК hsc70
PM.7	5' - UGCAG <u>AUGAUGU</u> AAAAUAGCGACGGGCGGUG <u>CUGA</u> GAG AUG <u>GUGAUGA</u> CAAAUGAAAACACUUUCAAU <u>CUGA</u> UGCA-3'	Аденозин – точка разветвления сплайсинга
PM.8	5' - UGCAG <u>AUGAUGU</u> AAAAUAGCGACGGGCGGUG <u>CUGA</u> GAG AUG <u>GUGAUGA</u> AAAUUAGGAACUCACCAAAA <u>CUGA</u> UGCA-3'	Донорный сайт сплайсинга
PM.9	5' - UGCAG <u>AUGAUGU</u> AAAAUAGCGACGGGCGGUG <u>CUGA</u> GAG AUG <u>GUGAUGA</u> AAAUUAGGAACUCACCAAAA <u>CUGA</u> UGCA-3'	Первый нуклеотид интрона
PM.10	5' - UGCAG <u>AUGAUGU</u> AAAAUAGCGACGGGCGGUG <u>CUGA</u> GAG AUG <u>GUGAUGA</u> ACAGAUGCCAAACGU <u>CUGA</u> UGCA-3'	Акцепторный сайт сплайсинга
PM.11	5' - UGCAG <u>AUGAUGU</u> AAAAUAGCGACGGGCGGUG <u>CUGA</u> GAG AUG <u>GUGAUGA</u> UACAGAUGCCAAACGU <u>CUGA</u> UGCA-3'	Последний нуклеотид интрона

*AUGAUGU – консервативные элементы C/D-бокс-РНК; A – нуклеотиды, комплементарные нуклеотиду-мишени.

человека. Последовательности аналогов C/D-бокс-РНК представлены в табл. 1.

В результате трансфекции клеток MCF-7 синтетическими аналогами C/D-бокс-РНК и анализа вариантов альтернативного сплайсинга пре-мРНК гена *HSPA8* установлено, что в контрольных клетках MCF-7 детектируются два варианта альтернативного сплайсинга этой пре-мРНК – основная и минорная (рис. 2, дорожки К). Определение нуклеотидных последовательностей этих форм показало, что они отличаются наличием либо отсутствием второго экзона. В клетках, трансфицированных синтетическими C/D-бокс-РНК, направленными на нуклеотиды, критичные для сплайсинга пре-мРНК, увеличивается содержание минорной формы, т.е. формы без второго экзона (рис. 2А, дорожки 1–5). Таким образом установлено, что аналоги C/D-бокс-РНК, направленные на выбранные нуклеотиды пре-мРНК гена *HSPA8*, влияют на сплайсинг пре-мРНК-мишени и приводят к исключению второго экзона.

Эффективность трансфекции, распределение и стабильность синтетических аналогов C/D-бокс-РНК оценивали с помощью ОТ-ПЦР-анализа ядерной и цитоплазматической РНК клеток MCF-7, трансфицированных РНК PM.8. Из данных, представленных на рис. 3, видно, что через 3 ч после пассивной трансфекции клеток РНК PM.8 без липофектамина РНК не удается детектировать ни в ядерной, ни в цитоплазматической фракции клеток MCF-7 (рис. 3, дорожки 1, 7). После трансфекции клеток аналогом C/D-бокс-РНК в комплексе с липофектаминам РНК присутствует как в цитоплазматической, так и в ядерной фракции даже через 26 ч после трансфекции (рис. 3, дорожки 5, 11). Все это

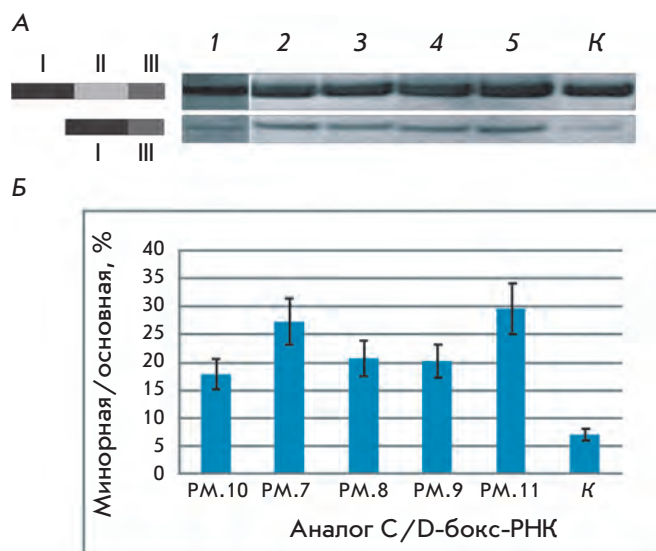


Рис. 2. Влияние синтетических аналогов U24 РНК на сплайсинг пре-мРНК гена *HSPA8*. А – продукты ОТ-ПЦР вариантов сплайсинга пре-мРНК гена *HSPA8*. Дорожки соответствуют продуктам амплификации кДНК: 1–5 – клетки, трансфицированные аналогами РНК PM.10, РНК PM.7, РНК PM.8, РНК PM.9, РНК PM.11 соответственно; К – контрольные клетки MCF-7, инкубированные с липофектаминам без РНК. Продукты ПЦР анализировали гель-электрофорезом в 4% ПААГ. Слева схематически представлены анализируемые варианты сплайсинга пре-мРНК-мишени. I, II, III – порядковые номера экзонов в структуре пре-мРНК. Б – Диаграмма соотношения выхода продуктов амплификации кДНК основной и минорной формы альтернативного сплайсинга пре-мРНК белка теплового шока hsc70. РНК PM.7–РНК PM.11 – клетки трансфицировали аналогами C/D-бокс-РНК РНК PM.7–РНК PM.11 соответственно. К – Контрольные клетки MCF-7 инкубировали с липофектаминам без РНК.

Время инкубации, ч	3	3	21	21	26	21	3	3	21	21	26	21
Аналог С/D-РНК	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Липофектамин	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+

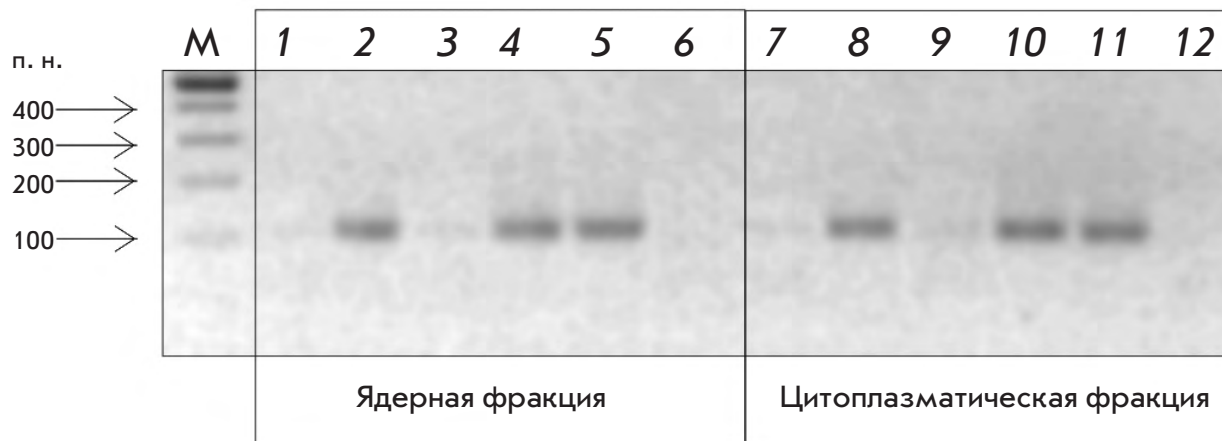


Рис. 3. Анализ стабильности С/D-бокс-РНК РМ.8 в клетках MCF-7 методом ОТ-ПЦР. Клетки инкубировали с аналогом РМ.8 в присутствии липофектамина (2, 4, 5, 8, 10, 11) либо без липофектамина (1, 3, 7, 9) в течение указанного времени (3, 21 либо 26 ч). Контрольные клетки инкубировали с липофектамином без РМ.8 (6, 12) в течение 21 ч. 1–6 – Продукты ОТ-ПЦР кДНК РНК, выделенной из ядерной фракции; 7–12 – продукты ОТ-ПЦР кДНК РНК, выделенной из цитоплазматической фракции. Продукты ОТ-ПЦР разделяли гель-электрофорезом в 2% агарозном геле. М – маркер молекулярной массы ДНК.

позволяет заключить, что в присутствии липофектамина синтетические С/D-бокс-РНК эффективно проникают в цитоплазму и ядро клеток, где могут участвовать в процессинге пре-мРНК-мишени.

Данные ОТ-ПЦР хорошо согласуются с результатами анализа распределения меченой FAM РНК РМ.8 в клетках MCF-7 при помощи флуоресцентной микроскопии. Так, при инкубации клеток в среде с меченой FAM РНК С/D-бокс-РНК в комплексе с липофектамином происходит захват, интернализация и распределение РНК и в цитоплазме, и в ядре клеток (рис. 4).

Известно, что посттранскрипционным модификациям – псевдоуридилрованию и 2'-О-метилованию – чаще подвергаются нуклеотиды рРНК, непосредственно вовлеченные в формирование активных центров рибосом или расположенные вблизи них [11]. Эти данные позволяют предположить, что посттранскрипционные модификации существенно влияют на структуру рРНК в процессе сборки и, в конечном счете, определяют функциональность рибосом [11–13].

Для оценки способности аналогов С/D-бокс-РНК направлять модификацию рРНК анализировали индукцию 2'-О-метилования мишени второй области узнавания – G1702 18S рРНК. G1702 был выбран в качестве мишени как один из ключевых нуклеотидов декодирующего центра человеческих рибосом

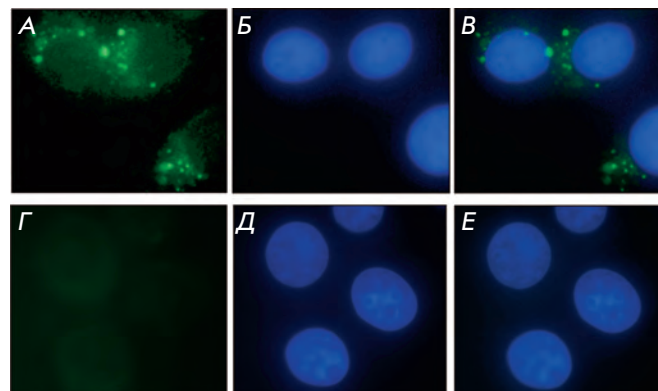


Рис. 4. Анализ накопления С/D-бокс-РНК РМ.8 в клетках MCF-7 методом флуоресцентной микроскопии. Представлены изображения трансфицированных (А – В) и контрольных клеток (Г – Е): А, Г – зеленый фильтр (FAM-меченый аналог С/D-бокс-РНК РМ.8); Б, Д – синий фильтр (окрашивание ядер с помощью DAPI); В, Е – наложение двух изображений.

[14]. В структуре рРНК из клеток MCF-7, трансфицированных синтетическими аналогами, методом ограниченного щелочного гидролиза не удалось обнаружить дополнительного 2'-О-метилованного нуклеотида в положении G1702 18S рРНК (рис. 5). Присутствие 2'-О-метилованного нуклеотида в составе рРНК в продуктах обратной транскрип-

трацией РНК – 3.0, 10.0 и 70.0 нМ. Из *рис. 6* видно, что наибольшее снижение жизнеспособности (>35%) вызывали С/D-боксы-РНК, направленные на U1827 18S рРНК, G4499, U4500 и U4502 28S рРНК. При этом аналоги U24 РНК, первая область узнавания которых направлена на пре-мРНК белка hsc70, вызывают снижение жизнеспособности и пролиферации клеток не более чем на 22% (*рис. 6*, РМ.7 и РМ.8).

Для анализа индукции *de novo* 2'-О-метилирования нуклеотидов-мишеней клетки MCF-7 трансфицировали аналогами С/D-боксы-РНК (*табл. 2*) и выявляли 2'-О-метилированные нуклеотиды рРНК методом ограниченного щелочного гидролиза. Установлено, что в пуле суммарной РНК трансфицированных клеток MCF-7 вклад форм рРНК, содержащих 2'-О-метилированный нуклеотид-мишень, был ниже уровня чувствительности метода детекции.

Совокупность данных об изменении жизнеспособности клеток под действием С/D-боксы-РНК и наблюдаемое отсутствие модификации нуклеотидов-мишеней позволяют предположить, что влияние аналогов на клетки человека может быть обусловлено участием С/D-боксы-РНК не только в 2'-О-метилировании нуклеотидов рРНК, но и в других этапах посттранскрипционного процессинга рРНК и сборки рибосом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Консервативные структурные элементы С/D-боксы-РНК – С/С' (RUGAUGA) и D/D' (CUGA)-боксы, а также область узнавания мишени обеспечивают способность этих РНК участвовать в формировании каталитического комплекса с белками метилтрансферазного комплекса и направлять 2'-О-метилирование заранее заданного нуклеотида [1, 2, 15]. Область узнавания мишени С/D-боксы-РНК представляет собой последовательность из 10–21 нуклеотида, комплементарную РНК-мишени, при этом метилируемый нуклеотид комплементарен пятому нуклеотиду мярРНК с 5'-стороны от D-боксы [7].

Основными мишенями С/D-боксы-РНК в клетках эукариот являются рРНК и мярРНК. В то же время обнаружены мярРНК, которые участвуют в процессинге пре-мРНК [6]. Ранее уже было установлено, что С/D-боксы-РНК могут взаимодействовать с транскриптами, синтезируемыми РНК-полимеразой II, и направлять 2'-О-метилирование заранее заданного нуклеотида РНК-мишени. При этом эффективность модификации нуклеотида-мишени значительно ниже, чем РНК-мишеней, синтезируемых в ядрышке РНК-полимеразой I [2]. Вместе с тем известно, что химическая модификация (в частности, метилирование) 2'-ОН-групп нуклеотидов, участвующих в сплайсинге пре-мРНК, существенно влияет на эффективность

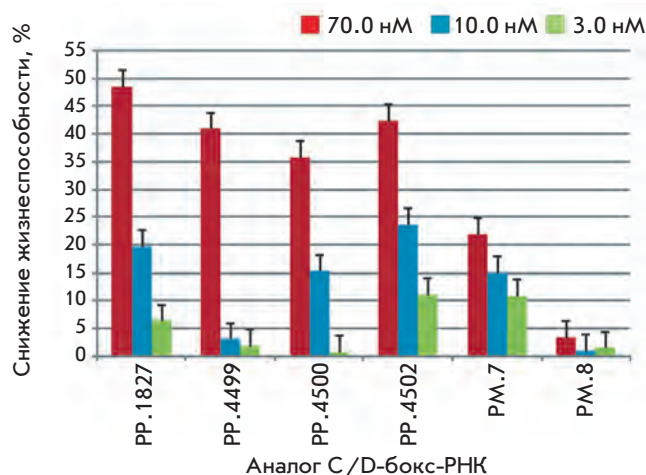


Рис. 6. Влияние синтетических аналогов С/D-боксы-РНК на жизнеспособность клеток MCF-7. Клетки MCF-7 после трансфекции комплексом РНК/липофектамин инкубировали в течение 3 сут. Показано снижение жизнеспособности (средние и стандартные отклонения МТТ-индекса в серии из трех независимых экспериментов) клеток, инкубированных в присутствии: 3.0 нМ (зеленый); 10.0 нМ (синий); 70.0 нМ (красный) РНК. Снижение жизнеспособности 0% соответствует МТТ-индексу клеток, инкубированных с липофектамином без РНК.

этапов созревания пре-мРНК [16]. Поэтому аналоги С/D-боксы-РНК, направляющие 2'-О-метилирование нуклеотидов пре-мРНК, представляют перспективную модель для разработки средств регуляции процессов сплайсинга.

В представленной работе сконструированы и получены аналоги U24 малой ядрышковой С/D-боксы-РНК, направленные на нуклеотиды пре-мРНК гена *HSPA8*, кодирующего белок теплового шока (hsc70) (*рис. 1*). Нами установлено, что трансфекция клеток человека синтетическими аналогами С/D-боксы-РНК, направленными на донорный и акцепторный сайты сплайсинга второго интрона, аденозин – точку разветвления сплайсинга, первый и последний нуклеотиды первого интрона пре-мРНК *HSPA8* (*табл. 1*), приводит к увеличению количества продукта сплайсинга пре-мРНК без второго экзона (*рис. 2*). Можно предложить два основных механизма влияния аналогов С/D-боксы-РНК на процессинг пре-мРНК-мишени – 2'-О-метилирование нуклеотида-мишени и комплементарное взаимодействие антисмыслового участка С/D-боксы-РНК с РНК-мишенью. Оба пути потенциально могут привести к ингибированию отдельных этапов сплайсинга и, как результат, к изменению соотношения вариантов альтернативного сплайсинга пре-мРНК-мишени.

Методы детекции 2'-О-метилированных нуклеотидов, широко применяемые в настоящее время, не позволяют эффективно выявлять такие модификации в мРНК и пре-мРНК. Поэтому нельзя однозначно сказать, происходит ли метилирование нуклеотида-мишени и обусловлено ли влияние на сплайсинг 2'-О-метилированием пре-мРНК-мишени. Известно, что ключевые точки сплайсинга пре-мРНК в разной степени чувствительны к модификациям 2'-ОН-групп остатков рибозы [16]. Полученные данные не позволяют говорить о существенных различиях в эффективности подавления сплайсинга аналогами C/D-бокс-РНК, направленными на разные нуклеотиды пре-мРНК, поэтому нельзя исключать возможность того, что наблюдаемое частичное изменение соотношения форм альтернативного сплайсинга пре-мРНК-мишени обусловлено ингибированием сплайсинга антисмысловой РНК по механизму, описанному для различных производных олигонуклеотидов [17–19].

Для участия в сплайсинге искусственная РНК должна взаимодействовать с пре-мРНК-мишенью внутри ядра. Как было показано, в присутствии липофектамина аналоги C/D-бокс-РНК эффективно проникают в клетки человека (рис. 3, 4). Из рис. 3 видно, что аналог C/D-бокс-РНК достоверно детектируется методом ОТ-ПЦР спустя 26 ч после однократной трансфекции с использованием липофектамина в ядерной и цитоплазматической фракциях РНК клеток MCF-7. Полученные данные указывают на то, что искусственные C/D-бокс-РНК потенциально доступны для взаимодействия с РНК-мишенями, локализованными внутри ядра. Накопление синтетической РНК в клетках подтверждается методом флуоресцентной микроскопии (рис. 4). Более того, установлено, что синтетические аналоги C/D-бокс-РНК в присутствии липофектамина эффективно сохраняются и обнаруживаются методом ОТ-ПЦР внутри клеток человека спустя 72 ч после однократной трансфекции (данные не иллюстрированы). В то же время в случае трансфекции без использования липофектамина синтетические РНК не детектируются в клетках человека методом ОТ-ПЦР уже через 3 ч после добавления в культуральную среду (рис. 3).

У всех полученных нами аналогов U24 мяоРНК одна из двух областей узнавания мишени сконструирована таким образом, чтобы направлять 2'-О-метилирование G1702 18S рРНК человека (табл. 1). Ранее мы показали, что трансфекция клеток человека синтетическими аналогами C/D-бокс-РНК, направленными на нуклеотиды рРНК (табл. 2), вызывает терминацию обратной транскрипции на нуклеотидах-мишенях [20, 21]. Однако анализ 2'-О-метилирования G1702 18S рРНК

клеток, трансфицированных аналогами C/D-бокс-РНК, методом частичного щелочного гидролиза не выявил дополнительной 2'-О-метильной группы в заданном положении (рис. 5). Не обнаружено также *de novo* 2'-О-метилирования нуклеотидов рРНК – мишеней аналогов, перечисленных в табл. 2 (после трансфекции клеток соответствующими РНК). При этом с помощью использованного метода нам удавалось определить положение ряда известных 2'-О-метилированных нуклеотидов рРНК человека.

Для объяснения отсутствия модификации нуклеотидов-мишеней (кроме известных ограничений методов анализа [8]) необходимо дополнительно рассмотреть следующие данные. Известно, что участие C/D-бокс-РНК в 2'-О-метилировании рРНК клеток человека возможно только при условии узнавания этой РНК белками – субъединицами метилтрансферазного комплекса – фибриларином, NOP56p, NOP58p и 15.5 кДа, и формирования комплекса с участием C/D-бокс-РНК [22–24]. Поэтому наблюдаемый низкий выход 2'-О-метилирования мишеней можно объяснить низкой эффективностью сборки каталитически компетентных метилтрансферазных комплексов с аналогами C/D-бокс-РНК. Вместе с тем, ранее Liu В. и соавт. [3, 4, 25] при трансфекции клеток дрожжей ДНК-конструкциями, кодирующими аналоги C/D-бокс-РНК, показали, что в трансфицированных клетках происходит экспрессия и созревание искусственных мяоРНК. Оказалось также, что экспрессия C/D-бокс-РНК, направленных на ряд нуклеотидов рРНК, существенно снижала скорость пролиферации и жизнеспособность клеток. Совокупность полученных данных позволила заключить, что именно 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК, направляемое аналогами C/D-бокс-РНК, было основной причиной влияния ДНК-конструкций на скорость пролиферации клеток. Однако в случае ряда C/D-бокс-РНК [3, 4, 25] удалось выявить лишь низкий уровень 2'-О-метилирования (либо отсутствие модификации) нуклеотидов-мишеней. С другой стороны, известно, что посттранскрипционные модификации – 2'-О-метилирование и псевдоуридилирование, происходят на стадии созревания 47S рРНК-предшественника [7, 26–28]. На стадии сборки функциональных рибосом проверяется качество рРНК-транскрипта, и неправильные, нефункциональные РНК-транскрипты подвергаются при этом деградации в экзосомах [29]. Синтетические аналоги C/D-бокс-РНК направлены на нуклеотиды рРНК, непосредственно участвующие в формировании и функционировании активных центров рибосомы. Возможно, 2'-О-метилирование рРНК, направляемое синтетическими аналогами C/D-бокс-РНК, существенно влияет на структуру рРНК и функ-

циональность рибосом, что, как следствие, приводит к быстрой деградации модифицированной РНК и ее низкому содержанию в трансфицированных клетках [25, 29].

Несмотря на наблюдаемое отсутствие модификации нуклеотида-мишени, искусственные С/D-боксы-РНК, комплементарно взаимодействуя с рРНК-мишенью, могут участвовать в регуляции процессов созревания рРНК-транскриптов, а также в сборке и функционировании рибосом. Таким образом, синтетические аналоги С/D-боксы-РНК могут участвовать в процессах жизнедеятельности трансфицированных клеток и, как результат, влиять на жизнеспособность и пролиферацию клеток человека.

Влияние аналогов С/D-боксы-РНК на жизнеспособность клеток человека МСF-7 мы оценивали с использованием МТТ-теста. Полученные нами данные позволили заключить, что трансфекция клеток синтетическими аналогами, первая область узнавания которых направлена на нуклеотиды 18S и 28S рРНК (табл. 2), приводит к снижению их жизнеспособности на 36–48% при начальной концентрации синтетической РНК в среде 70.0 нМ (рис. 6, РР.1827, РР.4499, РР.4500, РР.4502). В то же время синтетические аналоги, направленные одновременно на пре-мРНК белка теплового шока hsc70 и на G1702 18S рРНК (табл. 1), снижали жизнеспособность клеток только на 20–25% в диапазоне начальной концентрации 3.0–70.0 нМ (рис. 6, РМ.7, РМ.8).

При трансфекции клеток МСF-7 синтетическими аналогами С/D-боксы-РНК, направленными на U1827 18S рРНК, G4499, U4500 и U4502 28S рРНК, значительно снижалась скорость пролиферации и образования монослоя, а также изменялась морфология клеток. При этом уровень снижения жизнеспособности отличался у разных аналогов и зависел от нуклеотида-мишени и начальной концентрации РНК в культуральной среде (рис. 6).

Различие во влиянии синтетических аналогов С/D-боксы-РНК на жизнеспособность клеток МСF-7 указывает на то, что в процессе трансфекции эти РНК вовлекаются в регуляцию жизненно важных процессов в клетках человека. Тот факт, что это

различие обусловлено изменением структуры области узнавания мишени, позволяет предположить, что основной процесс, модулируемый аналогами С/D-боксы-РНК, это посттранскрипционный процессинг пре-рРНК. Необходимо отметить, что в качестве мишеней мы выбрали нуклеотиды рРНК, которые входят в состав активных центров рибосом – декодирующего и пептидилтрансферазного (табл. 2). Ранее Liu B. и соавт. [3, 4, 25] показали, что экспрессия в клетках дрожжей С/D-боксы-РНК, направленных на эти нуклеотиды, вызывала подавление их роста и приводила к частичной деградации рРНК.

Подавление жизнеспособности клеток человека под действием аналогов С/D-боксы-РНК указывает на их участие в регуляции процессов жизнедеятельности трансфицированных клеток. Наблюдаемое отсутствие модификации нуклеотидов-мишеней позволяет предположить, что аналоги С/D-боксы-РНК, направленные на рРНК, слабо вовлекаются в процессы 2'-О-метилирования нуклеотидов рРНК, но, возможно, участвуют в других этапах посттранскрипционного процессинга рРНК и в созревании рибосом.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе показано, что трансфекция клеток МСF-7 – аденокарциномы молочной железы человека, синтетическими аналогами С/D-боксы-РНК, направленными на нуклеотиды пре-мРНК белка теплового шока hsc70, приводит к нарушению сплайсинга пре-мРНК-мишени. Трансфекция клеток МСF-7 аналогами С/D-боксы-РНК, направленными на нуклеотиды 18S и 28S рРНК, ключевые для функционирования рибосом, вызывает снижение жизнеспособности клеток. Полученные результаты указывают на перспективность разработки средств регуляции трансляции и экспрессии генов человека на основе структуры мяоРНК. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 10-04-01386-а и 10-04-01442-а), грантом Президиума СО РАН № 18 (2009–2011 гг.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bachelierie J.P., Cavaille J., Huttenhofer A. // *Biochimie*. 2002. V. 84. P. 775–790.
- Cavaille J., Nicoloso M., Bachelierie J.P. // *Nature*. 1996. V. 383. P. 732–735.
- Liu B., Fournier M. // *RNA*. 2004. V. 10. P. 1130–1141.
- Liu B., Ni J., Fournier M. // *Methods*. 2001. V. 23. P. 276–286.
- Vitali P., Basyuk E., Le M.E., Bertrand E., Muscatelli F., Cavaille J., Huttenhofer A. // *J. Cell. Biochem*. 2005. V. 169. P. 745–753.
- Kishore S., Stamm S. // *Science*. 2006. V. 311. P. 230–232.
- Kiss-Laszlo Z., Henry Y., Bachelierie J.P., Caizergues-Ferrer M., Kiss T. // *Cell*. 1996. V. 85. P. 1077–1088.
- Maden B. // *Methods*. 2001. V. 25. P. 374–382.
- Qu L.H., Henry Y., Nicoloso M., Michot B., Azum M.C., Renalier M.H., Caizergues-Ferrer M., Bachelierie J.P. // *Nucl. Acids Res*. 1995. V. 23. P. 2669–2676.
- Rohde M., Daugaard M., Jensen M.H., Helin K., Nylandsted J., Jaattela M. // *Genes Dev*. 2005. V. 19. P. 570–582.
- Decatur W.A., Fournier M.J. // *Trends Biochem. Sci*. 2002. V. 27. P. 344–351.
- King T.H., Liu B., McCully R.R., Fournier M.J. // *Mol. Cell*.

2003. V. 11. P. 425–435.
13. Baxter-Roshek J.L., Petrov A.N., Dinman J.D. // PLoS ONE. 2007. V. 2. e174.
14. Graifer D.M., Karpova G.G., Knorre D.G. // Biochemistry. 2001. V. 66. P. 585–602.
15. Kiss-Laszlo Z., Henry Y., Kiss T. // EMBO J. 1998. V. 17. P. 797–807.
16. Moore M., Sharp P. // Science. 1992. V. 256. P. 992–997.
17. Dominski Z., Kole R. // Mol. Cell. Biol. 1994. V. 14. P. 7445–7454.
18. Sazani P., Kole R. // J. Clin. Invest. 2003. V. 112. P. 481–486.
19. Zalachoras I., Evers M.M., van Roon-Mom W.M., Aartsma-Rus A.M., Meijer O.C. // Front. Mol. Neurosci. 2011. V. 4. P. 1–12.
20. Semenov D.V., Stepanov G.A., Baryakin D.N., Koval O.A., Kuligina E.V., Richter V.A. // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum / Ed. Gahan P.B. Springer Science+Business Media B.V. 2011. P. 233–237.
21. Semenov D.V., Vratskih O.V., Kuligina E.V., Richter V.A. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008. V. 1137. P. 119–124.
22. Watkins N.J., Segault V., Charpentier B., Nottrott S., Fabrizio P., Bachi A., Wilm M., Rosbash M., Branlant C., Luhrmann R. // Cell. 2000. V. 103. P. 457–466.
23. Tollervey D., Lehtonen H., Jansen R., Kern H., Hurt E.C. // Cell. 1993. V. 72. P. 443–457.
24. Newman D.R., Kuhn J.F., Shanab G.M., Maxwell E.S. // RNA. 2000. V. 6. P. 861–879.
25. Liu B., Liang X.-H., Piekna-Przybylska D. // RNA Biol. 2008. V. 5. P. 249–254.
26. Ganot P., Bortolin M.L., Kiss T. // Cell. 1997. V. 89. P. 799–809.
27. Panse V.G., Johnson A.W. // Trends Biochem. Sci. 2010. V. 35. P. 260–266.
28. Freed E., Bleichert F., Dutca L., Baserga S. // Mol. Biosyst. 2010. V. 6. P. 481–493.
29. Vanacova S., Stefl R. // EMBO Rep. 2007. V. 8. P. 651–657.

УДК 575.22:340.6

Снижение риска инфицирования ВИЧ и летальности у гетерозигот по делеционному аллелю *CCR5del32* гена хемокинового рецептора: исследование случая фокусной нозокомиальной ВИЧ-инфекции и мета-анализ

С. А. Боринская¹, Ж. М. Кожекбаева^{1#}, А. В. Залесов^{1,2}, Е. В. Ользеева³, А. Р. Максимов⁴, С. И. Куцев^{5##}, М. М. Гараев⁶, А. В. Рубанович¹, Н. К. Янковский^{1,2,7*}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

²Московский физико-технический институт, 141700, Московская область, Долгопрудный, Институтский пер., 9

³Министерство здравоохранения и социального развития Республики Калмыкия, 358000, Элиста, ул. Н. Очирова, 6

⁴ГУ «Центр крови Республики Калмыкия», 358000, Элиста, ул. Пушкина, 52

⁵Ростовский государственный медицинский университет, 344022, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29

⁶НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

⁷Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119899, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

В настоящее время Университет Майами, Флорида, США.

В настоящее время Российский национальный исследовательский медицинский университет, Москва.

*E-mail: yankovsky@vigg.ru

Поступила в редакцию 17.10.2011 г.

РЕФЕРАТ Делеционный аллель *CCR5del32* гена хемокинового рецептора **R5** в гомозиготном состоянии почти полностью предотвращает инфицирование его носителей вирусом иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1). Однако данные о влиянии гетерозиготного носительства этого аллеля на риск инфицирования противоречивы. Мы исследовали влияние гетерозиготного носительства аллеля *CCR5del32* на риск инфицирования, сравнивая частоты этого аллеля в группе детей (27 калмыков, 50 русских) с нозокомиальной ВИЧ-инфекцией (G-подтип ВИЧ-1) и в популяционных контрольных группах. В группе ВИЧ-инфицированных частота аллеля *CCR5del32* оказалась ниже, чем в контрольной группе, но полученные различия были незначимыми. Аналогичные результаты приведены и в ряде ранее опубликованных статей. Незначимость различий может быть обусловлена либо случайным варьированием частот аллеля в отсутствие протективного эффекта, тогда при увеличении размера выборки различия частот останутся незначимыми, либо недостаточным размером выборки при наличии протективного эффекта. Поэтому, чтобы различить эти две возможности, мы провели мета-анализ опубликованных результатов 25 исследований (всего 5963 ВИЧ-инфицированных и 5048 индивидов в контрольных группах), включая наши собственные экспериментальные данные. Анализ показал, что аллель *CCR5del32* в гетерозиготном состоянии препятствует инфицированию его носителей ВИЧ-1 ($OR = 1.22$, $CI_{95\%} = 1.10-1.36$). Риск инфицирования гетерозигот *CCR5wt/del32* не менее чем на 13% ниже по сравнению с гомозиготами *CCR5wt/wt*. Подобные оценки для европеоидных групп получены впервые. В исследованной нами группе уровень смертности у гетерозиготных носителей аллеля *CCR5del32* через 15 лет после инфицирования был на 40.9% ниже, чем в группе лиц, не имеющих этого аллеля. Размер изученной выборки был небольшим, а различия в уровне смертности в зависимости от генотипа по полиморфизму *CCR5del32* статистически незначимыми ($OR = 2.0$; $p = 0.705$), однако полученные нами

оценки качественно и количественно совпадают с ранее опубликованными данными. Обсуждаются особенности проведения мета-анализа, влияющие на пороговую величину выявляемых эффектов и их статистическую значимость. Оценено влияние частот аллеля *CCR5del32* на межэтнические различия в инфицируемости ВИЧ и смертности от СПИДа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ВИЧ-инфекция, нозокомиальная инфекция, риск смерти, риск инфицирования, ген хемокинового рецептора, аллель *CCR5del32*, мета-анализ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемия СПИДа, начавшаяся с зарегистрированных в 1981 г. единичных случаев, в настоящее время представляет одну из важнейших проблем здравоохранения как в России, так и во всем мире [1]. Развитие эпидемического процесса в России характеризуется формированием нозокомиальных очагов инфекции в 1988–1989 гг. Вспышка инфекции началась с госпитализированного в детскую больницу г. Элисты ВИЧ-инфицированного ребенка и в результате несоблюдения противоэпидемических мероприятий распространилась в больницах Калмыкии, Ростовской, Волгоградской областей и Ставропольского края. Всего из одного источника (фокусная инфекция) было инфицировано более 260 детей и их матерей [2, 3], многие из которых к настоящему времени умерли (рис. 1).

У части ВИЧ-инфицированных наблюдается быстрое, за 2–3 года, развитие заболевания и появление симптомов СПИДа, тогда как у других носителей ВИЧ симптомы не проявляются на протяжении долгого времени. Различия в скорости прогрессии заболевания могут быть обусловлены как внешними факторами (условия инфицирования, сопутствующие заболевания, проводимое лечение), так и индивидуальными генетическими особенностями больного [4].

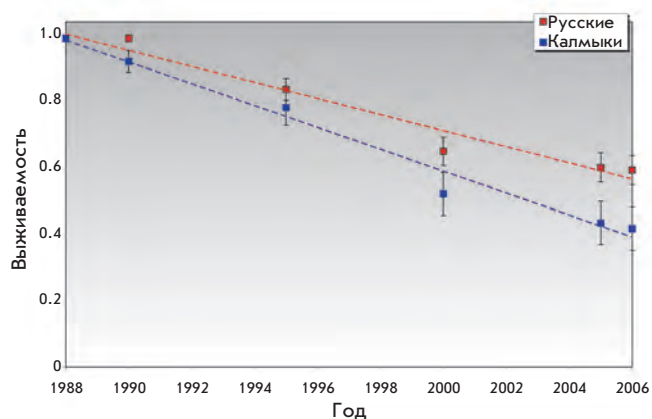


Рис. 1. Динамика выживаемости лиц с нозокомиальной ВИЧ-инфекцией – русских (Ростов-на-Дону – 107, Элиста – 13 человек) и калмыков (Элиста – 57 человек).

Среди генов человека, влияющих на ход развития ВИЧ-инфекции, наибольшее значение имеет ген *CCR5*, кодирующий СС-хемокиновый рецептор 5, опосредующий связывание ВИЧ с клеточной мембраной и проникновение определенных штаммов вируса в клетку [4]. Делеция 32 п.н. в гене *CCR5*, обозначаемая *CCR5del32* (rs333), приводит к синтезу нефункционального белка. У носителей делеции в гомозиготном состоянии функциональные рецепторы *CCR5* отсутствуют, а в случае гетерозиготного носительства их количество снижено.

Делеционный аллель *CCR5del32* встречается преимущественно в популяциях европейского происхождения. Частота его наиболее высока в странах Северной Европы (до 15–18%), тогда как в большинстве азиатских популяций частота этого аллеля не превышает 3–5%. В популяциях африканского происхождения и у коренного населения Америки и Океании этот аллель практически отсутствует [5–7].

Индивиды, гомозиготные по *CCR5del32*, доля которых в европейских популяциях составляет 1–2%, обладают высокой, но не абсолютной устойчивостью к инфицированию. Среди ВИЧ-инфицированных гомозиготные носители *CCR5del32* встречаются очень редко – описано всего 12 таких случаев из более 20 000 обследованных, и у большинства из них вирус обладал тропизмом к рецептору CXCR4, но не к *CCR5* [8–13]. Протективный эффект гомозиготности по аллелю *CCR5del32* подтвержден как в ряде эпидемиологических исследований (повышенная частота гомозигот среди ВИЧ-негативных индивидов, подвергавшихся риску инфицирования), так и при инфицировании *in vitro* клеток CD4⁺, полученных от индивидов с различными генотипами [14].

Протективный эффект гетерозиготного носительства *CCR5del32* проявлялся и в развитии симптомов СПИДа у ВИЧ-инфицированных. Не исключено, что возможность бессимптомного недиагностированного носительства ВИЧ гетерозиготами *CCR5del32*/+ может способствовать распространению инфекции. У ВИЧ-инфицированных гетерозиготных носителей *CCR5del32* вирусная нагрузка ниже, медленнее падает количество CD4⁺ Т-клеток, и симптомы СПИДа развиваются медленнее как у взрослых [8, 11, 13–17], так и у детей (большая часть которых ин-

фицирована перинатально) [18]. Частота гетерозиготных носителей *CCR5del32* значительно выше в группе лиц, инфицированных в 1980-х гг. и проживших более 10 лет после инфицирования [11].

Однако данные о том, что гетерозиготное носительство аллеля *CCR5del32* защищает от инфицирования ВИЧ, остаются противоречивыми. Так, в ряде работ частота гетерозигот среди инфицированных была ниже, чем среди неинфицированных, подвергавшихся риску инфицирования, или в общей выборке из той же популяции, что может указывать на частичную резистентность индивидов с генотипом *CCR5wt/del32* к ВИЧ-1 [10, 12]. В других исследованиях такой эффект обнаружен не был – различия в частотах гетерозигот *CCR5wt/del32* и/или аллеля *del32* между группами ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных индивидов либо отсутствовали, либо были статистически незначимыми [8, 19–21]. В представленной работе мы проанализировали влияние гетерозиготного носительства аллеля *CCR5del32* на выживаемость детей с фокусной нозокомиальной ВИЧ-инфекцией и риск инфицирования при инъекционном пути заражения, а также провели мета-анализ опубликованных данных с целью оценки возможного снижения риска инфицирования у гетерозиготных носителей аллеля *CCR5del32*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом послужили образцы крови из коллекции лаборатории биотехнологии НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, собранные в различные периоды между 1991 и 2007 гг. во время плановых медицинских обследований лиц с нозокомиальной ВИЧ-инфекцией. Получено согласие родителей обследованных детей на использование части образцов для научных исследований. Уникальность этой выборки ВИЧ-инфицированных заключается в том, что в ней отсутствует вариабельность в развитии инфекции, связанная с различиями штаммов вируса – все были инфицированы одним и тем же штаммом вируса (G-подтип ВИЧ-1), источником которого послужил единственный больной ребенок (фокусная нозокомиальная инфекция) [22, 23]. Кроме того, большинство больных принадлежали к двум этническим группам (русские и калмыки), что снижает возможное влияние генетической гетерогенности в каждой из когорт. Анонимные данные о дате рождения пациентов и смерти в случае летальных исходов получены для 107 ВИЧ-инфицированных Ростовской обл. (все русские) и 60 ВИЧ-инфицированных из г. Элисты (47 калмыков и 13 русских). Для исследования были доступны образцы крови ВИЧ-инфицированных детей – 50 русских и 27 калмыков (возраст детей – от менее 1 года до 16 лет, в среднем 2.7 года). Контролем служили образцы крови здоровых доноров.

Первую группу составили студенты медицинского университета г. Ростова-на-Дону (большинство 1986–1990 года рождения), по данным опроса русские в двух поколениях, родившиеся в Ростовской обл. Вторую контрольную группу составили калмыки, проживающие в г. Элисте (этническую принадлежность устанавливали по данным опроса). Образцы крови собирали с соблюдением процедуры информированного согласия. Проект генетического исследования одобрен Этической комиссией ИОГен РАН.

Геномную ДНК выделяли из образцов венозной крови (объем до 50 мкл) с помощью коммерческого набора DNAprep («Изоген», Москва) в соответствии с инструкцией производителя, в лаборатории биотехнологии НИИ вирусологии РАМН, оборудованной для работы с инфицированными образцами.

Генотипирование проводили с помощью ПЦР-амплификации образцов ДНК. Праймеры и условия амплификации описаны ранее [24]. Продукты ПЦР-амплификации подвергали электрофорезу в 2% агарозном геле для определения размера фрагментов.

Оценка величины протективного эффекта аллеля *CCR5del32* в гетерозиготном состоянии

Во всех выборках наблюдаемые эффекты единообразно характеризовали величиной отношения шансов (OR), которую рассчитывали как отношение шансов носительства генотипа *wt/wt* у ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных индивидов:

$$OR = \frac{P(wt/wt | ВИЧ+)}{1 - P(wt/wt | ВИЧ+)} / \frac{P(wt/wt | ВИЧ-)}{1 - P(wt/wt | ВИЧ-)} = \frac{P(wt/wt | ВИЧ+)P(wt/del | ВИЧ-)}{P(wt/del | ВИЧ+)P(wt/wt | ВИЧ-)},$$

где $P(* | ВИЧ+)$ и $P(* | ВИЧ-)$ – частоты генотипов в выборках инфицированных и здоровых соответственно. Отношение рисков (RR), которое определяется как отношение заболеваемости при различных генотипах, оценивали по формуле:

$$RR = \frac{P(ВИЧ+ | wt/wt)}{P(ВИЧ+ | wt/del)} = \frac{Se}{1 - Se} \cdot \frac{1 - P(wt/wt)}{P(wt/wt)},$$

где Se – чувствительность тестирования на предрасположенность, т.е. частота рисков генотипа *wt/wt* у больных, и $P(wt/wt)$ – популяционная частота рисков генотипа.

Статистическую значимость частотных различий оценивали с использованием двустороннего точного критерия Фишера.

Таблица 1. Распределение частот генотипов и аллелей по гену *CCR5* у ВИЧ-инфицированных детей и в контрольных выборках

Группа	N	Число индивидов (частоты генотипов, %)			Частота аллелей и стат. ошибка (\pm SE)		Сравнение ВИЧ+ и контрольной группы
		<i>wt/wt</i>	<i>wt/del</i>	<i>del/del</i>	<i>wt</i>	<i>del</i>	
ВИЧ, дети калмыки	27	27	0	0	1	0	OR = 2.85 p=0.558
Контроль, калмыки Элисты	70	67 (95.71)	3 (4.28)	0	0.979 \pm 0.012	0.021 \pm 0.012	
ВИЧ, русские дети	50	39 (78.0)	11 (22.0)	0	0.890 \pm 0.031	0.110 \pm 0.031	OR = 1.21 p = 0.690
Контроль, русские Ростовской обл.	99	73 (73.7)	25 (25.3)	1 (1.0)	0.864 \pm 0.024	0.136 \pm 0.024	

Таблица 2. Частоты аллеля *CCR5del32* (rs333) в группах русских и у калмыков

Популяция	N	Частота аллеля <i>CCR5del32</i>	CI _{95%}	Источник
Русские: Ленинградск. обл	33	0.166	0.083–0.300	[27]
Кострома	54	0.157	0.091–0.252	[28]
СПб.	50	0.130	0.069–0.223	[29]
Москва	83	0.139	0.088–0.208	[30]
Москва	176	0.122	0.088–0.164	[31]
Рязань	78	0.12	0.072–0.188	[32]
Липецк	48	0.104	0.045–0.192	[Гараев М.М., собственные данные]
Новосибирск	53	0.104	0.051–0.187	[33]
г. Лысьва	186	0.100	0.070–0.138	[34]
Москва, без указания национальности	171	0.091	0.062–0.129	[35]
Ростов-на-Дону	99	0.136	0.089–0.198	Данная работа
Русские дети, ВИЧ	50	0.110	0.054–0.198	–“–
Калмыки	70	0.021	0.004–0.063	–“–
Калмыки дети, ВИЧ	27	0	0–0.073	–“–

Мета-анализ проводили с использованием свободно распространяемой компьютерной программы для эпидемиологов WinPeri v. 10 (2010) [25]. Программа позволяет оценить среднее значение OR согласно модели с фиксированными эффектами (оценка Мантеля–Хензеля) и модели со случайными эффектами (оценка по DerSimonian-Laird). Выбор между моделями производится на основе анализа гетерогенности совокупности данных (Q-тест Кохрена).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Частота аллелей и генотипов у ВИЧ-инфицированных и в контрольных группах

У каждого ребенка из выборки детей с нозокомиальной ВИЧ-инфекцией и у индивидов из контрольных групп были определены генотипы по гену *CCR5* и выявлены носители аллеля *CCR5del32* (табл. 1). Рас-

пределение генотипов во всех группах не отличалось значительно от равновесного по Харди–Вайнбергу.

Частота аллеля *CCR5del32*, в популяции калмыков установленная впервые, составила 0.021 ± 0.012 . Такая низкая частота этого аллеля в популяции калмыков соответствует его частоте в соседствующих популяциях Кавказа (3–5%) и низкой частоте в популяциях Центральной Азии, родственных калмыкам по происхождению (например, 1.1% у монголов Китая [26]). В выборке из 27 ВИЧ-инфицированных детей калмыков носители этого аллеля не выявлены (отличия от частоты в контрольной группе незначимы: $p = 0.558$ по точному тесту Фишера).

У русских, согласно опубликованным данным, в различных географических группах частота аллеля *CCR5del32* варьирует от 0.104 до 0.157 (табл. 2) (см. обзор [7]). Так как большинство инфицированных русских детей в исследованной нами выборке

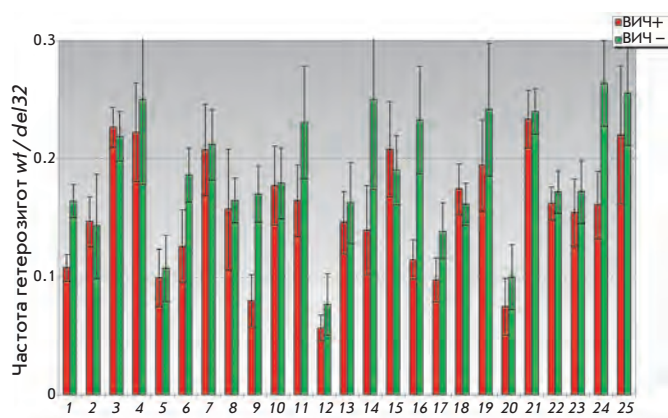


Рис. 2. Частоты гетерозиготного носительства аллеля *CCR5del32* среди ВИЧ-инфицированных (ВИЧ+) и здоровых лиц (ВИЧ-). 1 – бельгийцы и французы [10]; 2 – швейцарцы (ВИЧ-инфицированные [36], контроль [37]); 3 – евроамериканцы [38]; 4 – датчане [39]; 5 – итальянцы, Милан [40]; 6 – австралийцы [41]; 7 – финны [42]; 8 – словенцы [43]; 9 – испанцы, Астурия [44]; 10 – жители Москвы [19]; 11 – русские (ВИЧ-инфицированные – москвичи, контроль – русские, Рязань) [20]; 12 – испанцы, Южная Испания [45]; 13 – испанцы [46]; 14 – венгры [47]; 15 – русские, Пермский край [34]; 16 – евроамериканки [48]; 17 – немцы, Мюнхен [49]; 18 – евроамериканцы, Сиэтл [50]; 19 – поляки [51]; 20 – итальянцы [52]; 21 – эстонцы [21]; 22 – немцы [13]; 23 – словаки [53]; 24 – поляки, Щецин [54]; 25 – русские, Ростовская обл. (данная работа).

находились в больницах Ростова-на-Дону, а частота аллеля *CCR5del32* у русских Ростовской обл. не была известна, контрольную группу сформировали из добровольцев – студентов медицинского института Ростова-на-Дону, русских в двух поколениях (согласно данным опроса), родившихся в Ростовской обл. Частота аллеля *CCR5del32* в этой группе составила 0.136 ± 0.024 , что находится в пределах диапазона вариабельности частот в различных географических группах русских. У ВИЧ-инфицированных русских детей частота аллеля *CCR5del32* оказалась несколько ниже (0.110 ± 0.031), однако различия не достигали значимого уровня ($OR = 1.21, p = 0.69$).

При столь небольшом размере выборок более низкая частота аллеля *CCR5del32* у ВИЧ-инфицированных по сравнению с контролем может быть как случайным эффектом, так и результатом протективного действия этого аллеля.

В ряде работ получены данные о более низкой частоте аллеля *CCR5del32* и/или более низкой частоте гетерозигот *wt/del32* среди ВИЧ-инфицированных по сравнению с популяционным контролем, причем во многих случаях эти различия также не достигают

значимого уровня, тогда как в других исследованиях выявлено обратное соотношение частот (рис. 2 и база данных частот аллелей (лаборатория анализа генома ИОГен РАН) <http://vigg.ru/institute/podrazdelenija/otdel-genomiki-i-genetiki-cheloveka/laboratorija-analiza-genoma/allefdb/ccr5-hiv/>). Для оценки возможного протективного эффекта гетерозиготности по *CCR5del32* мы провели мета-анализ опубликованных данных по частоте гетерозигот *CCR5wt/del32* среди ВИЧ-инфицированных и в контрольных группах.

Мета-анализ: снижает ли гетерозиготность по *CCR5del32* риск инфицирования?

Для проведения мета-анализа из более чем 360 статей, выявляемых в PubMed по запросу «*CCR5 AND deletion AND HIV*» (сентябрь 2011 г.), отобрали статьи, в которых сравниваются частоты аллелей и генотипов в выборках ВИЧ-инфицированных и в соответствующих контрольных выборках неинфицированных индивидов. Публикации, в которых изучали азиатские, африканские и латиноамериканские популяции с частотой аллеля *CCR5del32* 1–3% или ниже, из анализа исключали.

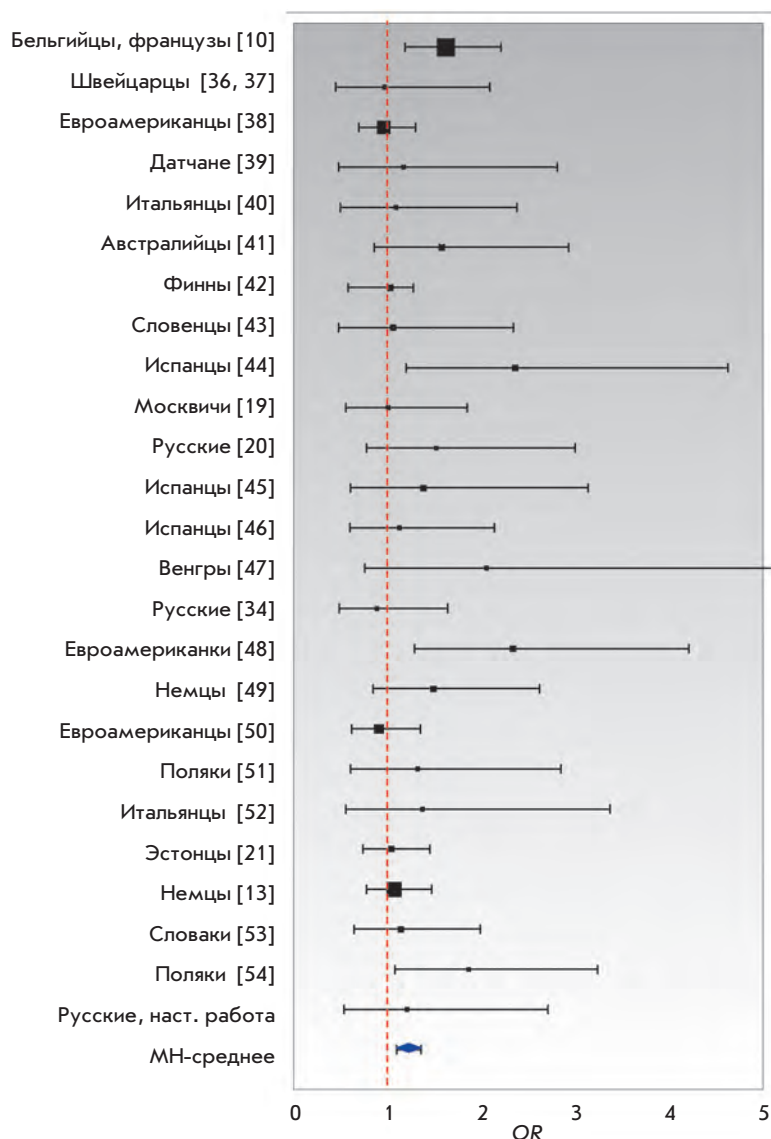
Из-за различий частот аллеля *CCR5del32* в популяциях европейского происхождения (от 5–8% на юге Европы до 15–18% на севере) [7] необходимо, чтобы этническая принадлежность индивидов контрольных групп (а в некоторых случаях и подгрупп внутри этнической группы) строго соответствовала принадлежности группы инфицированных. Поэтому публикации, в которых этническая принадлежность групп не указана или выборки не были этнически гомогенными, также исключили. В итоге для мета-анализа отобрали 25 групп европеоидов, включая нашу выборку, – всего 5967 ВИЧ-инфицированных и 5410 индивидов в контрольных группах (табл. 3).

Частота гомозиготных носителей делеции составила 4 из 5967 среди ВИЧ-инфицированных против 63 из 5410 в контроле. Такое соотношение соответствует $OR = 17.6$ при $p = 4.4 \times 10^{-16}$. В данном случае величина относительного риска приблизительно

Таблица 3. Уровень смертности к 2006 г. в исследованных выборках в зависимости от генотипа

Генотип	Русские	Калмыки
<i>wt/wt</i>	12 из 39 (30.8%)	11 из 27 (40.7%)
<i>wt/del32</i>	2 из 11 (18.2%)	–
Всего	14 из 50 (28.0%)	11 из 27 (40.7%)

Рис. 3. Оценки отношений шансов (*OR*) и соответствующие 95% доверительные интервалы для 25 выборок европеоидов (перечислены в подписи к рис. 2). Вертикальная пунктирная линия соответствует $OR = 1$ (отсутствие эффектов). Точки справа от этой прямой указывают на протективный эффект генотипа *wt/CCR5del32*. Размеры маркеров-квадратиков условно пропорциональны объемам выборок. Нижний маркер-ромб соответствует усредненной оценке *OR* по Мантелю–Хензелю (МН-среднее).



равна величине *OR*, т.е. вероятность инфицирования гомозиготных по делеции лиц в 17.6 раза меньше, чем носителей остальных генотипов. Близкие оценки протективного эффекта гомозиготного носительства делеции получены в отдельных исследованиях евроамериканцев при сравнении групп серонегативных индивидов, подвергавшихся риску инфицирования, с серопозитивными и популяционным контролем [9, 38] и в других исследованиях [10, 11]. Поэтому гомозиготы *CCR5del32/CCR5del32* были исключены из дальнейшего анализа, и для оценки риска инфицирования рассматривали соотношение гетерозиготных носителей аллеля *CCR5del32* и индивидов, у которых этот аллель отсутствовал, т.е. соотношение генотипов *wt/CCR5del32* и *wt/wt* в группах ВИЧ-инфицированных и в популяционном контроле.

Сравнение частот генотипов показало, что только в 4 из 25 исследований, вошедших в мета-анализ, частота гетерозигот *wt/CCR5del32* у ВИЧ-инфицированных была выше, чем у здоровых лиц (рис. 2). При предположении о случайности эффекта вероятность события «из 25 работ не более чем в четырех частота гетерозигот у больных выше, чем у здоровых» и равна 4.7×10^{-7} (аналогично вероятности выпадения не более четырех «орлов» в 25 бросаниях монеты).

Для каждой выборки вычислено отношение шансов (*OR*) и проведено их усреднение с учетом численности выборок и степени однородности эффектов. Результаты представлены в графической форме (рис. 3).

Проведенный по результатам 25 исследований мета-анализ обнаружил, что частота гетеро-

зигот *wt/CCR5del32* по отношению к гомозиготам *wt/wt* в выборках ВИЧ-инфицированных достоверно ниже, чем в контроле ($p = 0.0002$ по двустороннему точному тесту Фишера и $p = 0.00018$ по тесту χ^2). По Q-тесту Кохрена гетерогенность данных незначима: $\chi^2 = 25.29$, $p = 0.39$. Доля изменчивости, обусловленная гетерогенностью значений *OR*, равна $I^2 = 5.1\%$ ($CI_{95\%} = 0-36.4\%$). Эта величина существенно меньше критического значения (50%), что позволяет принять «модель с фиксированными эффектами», а для усреднения значений *OR* использовать формулу Мантеля-Хензеля (МН-среднее). Итоговое значение эффекта достаточно низкое – $OR = 1.22$, $CI_{95\%} = 1.10-1.36$. Однако эти оценки имеют большой запас устойчивости: необходимо добавить 28 исследований, в которых частоты генотипов не различались бы между выборками больных и в контроле ($OR = 1$), чтобы итоговое значение эффекта снизилось до незначимого уровня $OR = 1.1$.

При проведении мета-анализа принято рассматривать возможность искажения представленности данных в публикациях (publication bias). Это связано с тем, что и авторы работ и редакции журналов охотнее публикуют положительные результаты, чем отрицательные или «нулевые». Кроме того, слишком часто публикуются работы с большими эффектами, полученными на малых выборках. Все это может привести к завышению оценки усредненного значения эффекта при мета-анализе (рис. 4А). Стандартный метод проверки симметричности данных состоит

в построении зависимости величины эффекта (*OR*) от объема выборки (funnel-plot – «график-воронка»). Сильная асимметрия этого графика может указывать на избирательную представленность данных в публикациях. В нашем случае асимметрия незначима (рис. 4Б): ранговая корреляция Кендалла между *OR* и объемом выборки равна 0.21 при $p = 0.187$; асимметрия по регрессионному тесту [55] недостоверна ($p = 0.148$).

Таким образом при мета-анализе, в который вошли и наши собственные экспериментальные данные, выявлен статистически значимый, хотя и слабый протективный эффект гетерозиготного носительства аллеля *CCR5del32* в отношении инфицирования ВИЧ: $OR = 1.22$ при $p = 2 \times 10^{-4}$. Достаточно низкое значение *OR* объясняет, почему в большинстве статей не обнаружены значимые различия в частоте гетерозигот по данному аллелю (и частот аллеля) между ВИЧ-инфицированными и контрольными группами. Вычисления показывают, что при частоте делеционного аллеля, равной 10%, и $OR = 1.22$ значимый эффект ($p = 0.05$ при мощности 80%) может быть обнаружен лишь при общем объеме выборки 4500 (2250 больных и 2250 здоровых).

Полученная оценка $OR = 1.22$ не означает, что риск инфицирования у носителей генотипа *wt/wt* на 22% выше, чем у гетерозиготных носителей аллеля *CCR5del32*. *OR* – это отношение шансов, но не рисков инфицирования. Отношение рисков (*RR*), которое определяется как отношение заболеваемости

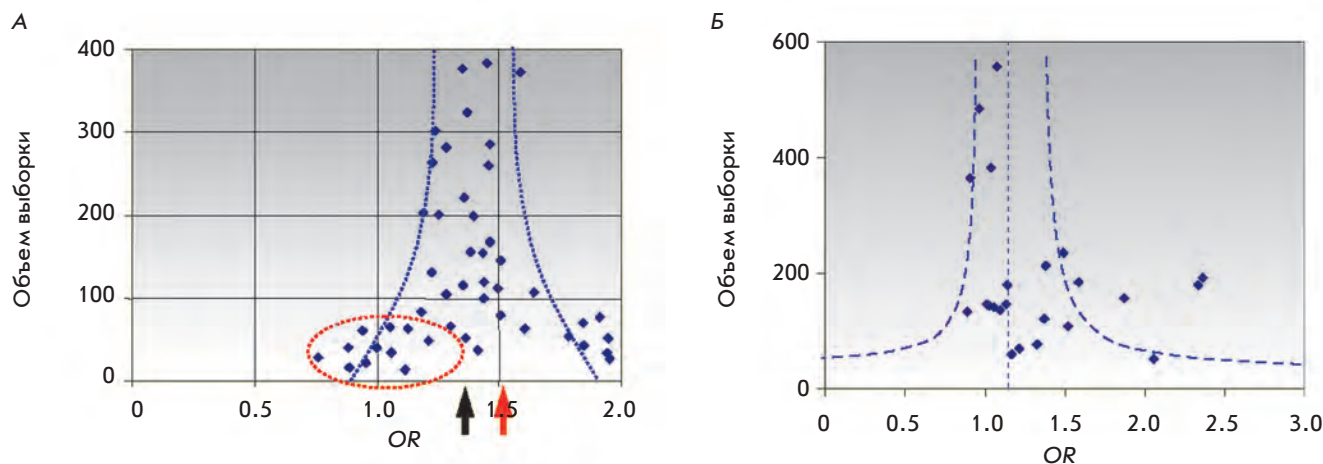


Рис. 4. Зависимость величины эффекта (*OR*) от состава выборок, вошедших в мета-анализ (funnel-plot – «график-воронка»). Сильная асимметрия этого графика может указывать на избирательную представленность данных в публикациях (publication bias). А – Гипотетическое распределение исследований по размеру изученных выборок и силе эффекта. При исключении менее охотно публикуемых результатов, полученных на малых выборках со слабыми эффектами (точки в пунктирном овале), значение *OR* оказывается завышенным (красная стрелка) относительно «реального» (черная стрелка). Б – Распределение исследований по размеру выборок и силе эффекта для 25 публикаций, включенных в мета-анализ в данной работе (асимметрия незначима).

при различных генотипах, невозможно непосредственно оценить в ассоциативных исследованиях типа «случай–контроль». Можно лишь предложить различные косвенные оценки RR на основе значений OR и популяционных частот аллелей, либо данных по заболеваемости [56]. Кроме того, всегда выполняется неравенство: $OR \geq RR$. По результатам настоящего мета-анализа соответствующие оценки равны: $SE = 0.851$ и $P(wt/wt) = 0.835$, откуда $RR = 0.13$. Таким образом, у гомозигот wt/wt вероятность инфицирования как минимум на 13% выше, чем у носителей аллеля $CCR5del32$.

Наша оценка основана на сравнении соотношения частот генотипов $wt/CCR5del32$ и wt/wt у ВИЧ-инфицированных и в популяционном контроле. При этом очевидно, что ВИЧ-инфицированные контактировали с вирусом и были инфицированы, а в популяционном контроле индивиды с вирусом не контактировали (доля контактировавших и/или ВИЧ-инфицированных предполагается пренебрежимо малой в исследованных популяциях европейского происхождения). Более точно оценить протективный эффект гетерозиготности можно при использовании контрольной группы из индивидов, контактировавших с вирусом, но оставшихся ВИЧ-негативными. Однако в существующих группах высокого риска (больные гемофилией; половые партнеры ВИЧ-инфицированных; потребители инъекционных наркотиков; мужчины, практикующие незащищенные рецептивные анальные половые контакты с мужчинами (MSM); лица, занимающиеся проституцией) доля индивидов, контактировавших с вирусом, сильно различается и не всегда может быть установлена. При проведении мета-анализа результатов таких исследований можно использовать модель со случайными эффектами. Однако из-за гетерогенности выборок оценки OR в различных исследованиях в значительной мере отражают не собственно протективный эффект аллеля в группе контактировавших с вирусом, а вероятность контакта с вирусом в различных группах риска.

Этот феномен можно проиллюстрировать, сравнивая частоты гомозигот по делеционному аллелю среди неинфицированных индивидов в двух группах риска – больных гемофилией [57] и мужчин MSM [38]. У неинфицированных индивидов в группе MSM частота гомозигот $CCR5del32/del32$ составила 4.5% (5 из 111 человек), а среди неинфицированных больных гемофилией – 16.3% (7 из 43 человек), при том, что популяционная частота таких гомозигот в европейских популяциях не превышает 1–2%. Различия в частотах гомозиготных носителей делеции в двух группах риска статистически значимы ($p = 0.038$, двусторонний тест Фишера). Более высокая частота

гомозигот $CCR5del32/del32$ среди больных гемофилией объясняется более высоким риском заражения – у получавших интенсивное лечение препаратами крови в 1978–1985 гг. он составлял 94% [57]. Так как почти 100% больных, получавших препараты крови, контактировали с вирусом, можно полагать, что более высокая частота гомозигот по делеционному аллелю, т.е. более выраженный протективный эффект, не может быть достигнут из-за генетической гетерогенности признака устойчивости к заражению макрофаготропными штаммами ВИЧ [58], подобно тому, как в природных условиях в одной и той же популяции происходит отбор протективных аллелей различных генов, обеспечивающих устойчивость к инфекции (например, к малярии).

Влияние гетерозиготности по аллелю $CCR5del32$ на уровень выживаемости ВИЧ-инфицированных индивидов

Внутри обеих выборок (русских и калмыков) ранее наблюдали вариабельность в скорости перехода ВИЧ-инфекции к СПИДу и в уровне летальности, связанную с факторами негенетической природы (возрастом инфицирования, который составляет в этих выборках от нескольких месяцев до 14 лет, в среднем 2.5 года), интенсивностью парентеральных вмешательств, сопутствующими заболеваниями [3].

К 2006 г. уровень смертности в исследованной нами выборке составил 32.5% (25 из 77 человек). Среди инфицированных русских детей смертность составила 28.0% (14 из 50), среди детей-калмыков – 40.7% (11 из 27). Уровень смертности русских в изученной группе к 2006 г. был на 31.2% ниже, чем у калмыков, однако при данных объемах выборок эти различия не были значимыми ($p = 0.311$). Тем не менее регрессии, описывающие динамику смертности в целом, значительно отличаются: угловой коэффициент наклона регрессии для русских детей составляет -0.016 ± 0.004 против -0.025 ± 0.002 для детей-калмыков ($p = 0.02$, двусторонний Z-тест). Для совокупности данных, приведенных на рис. 1, соответствующие оценки равны: -0.025 ± 0.002 у русских против -0.033 ± 0.002 у калмыков ($p = 0.005$, двусторонний Z-тест).

Мы проверили, влияет ли носительство аллеля $CCR5del32$ на выживаемость инфицированных и могут ли различия в продолжительности жизни после инфицирования в двух этнических группах быть связаны с различием в частоте $CCR5del32$.

В исследованной нами выборке у ВИЧ-инфицированных детей-калмыков делеционный аллель не выявлен – все они имели генотип wt/wt . Среди инфицированных русских детей с генотипом wt/wt уровень смертности составил

30.8% (12 из 39), тогда как среди носителей аллеля *CCR5del32* – 18.2% (2 из 11) (табл. 3). Таким образом, уровень смертности русских детей с генотипом *wt/CCR5del32* через 15 лет после инфицирования на 40.9% ниже, чем у детей без делеционного аллеля, однако эти различия статистически незначимы ($OR = 2.0$; $p = 0.705$). Ограниченный размер выборок не позволяет принять или опровергнуть гипотезу о том, что различия в продолжительности жизни в двух этнических группах связаны с различием в частотах аллеля *CCR5del32*. Тем не менее следует отметить буквальное совпадение полученных нами незначимых оценок с опубликованными ранее данными. Согласно результатам мета-анализа 19 когорт ВИЧ-инфицированных (всего 1635 европеоидов), протективный эффект гетерозиготного носительства аллеля *CCR5del32* проявляется 39-процентным снижением риска смерти [17]. При таком уровне эффекта ($OR = 2$) для достижения статистической значимости размер выборки инфицированных должен составлять не менее 550 человек при смертности 30% и 400 человек в момент, когда смертность достигает 60%.

Например, в исследовании 507 ВИЧ-инфицированных поляков, наблюдавшихся в течение 15 лет в период до внедрения антиретровирусной терапии, различия в уровне смертности между носителями генотипов *wt/del32* и *wt/wt* составили 49% (при общей смертности 19%), и эти различия были статистически значимыми ($p = 0.026$), тогда как у лиц, получавших лечение (442 индивида), такие различия были незначимыми ($p = 0.23$) [59].

ОБСУЖДЕНИЕ

На основе мета-анализа опубликованных данных нами впервые оценено влияние гетерозиготного носительства делеционного аллеля *CCR5del32* на риск ВИЧ-инфицирования в популяциях европейского происхождения (без учета пути заражения, серотипа вируса и различий в проведении антиретровирусной терапии). Выявленный нами протективный эффект невелик ($OR = 1.22$), но статистически значим, и соответствует, согласно расчетам, не менее чем 13-процентному снижению риска инфицирования у носителей генотипа *CCR5wt/del32*. Небольшая величина OR объясняет, почему в большинстве статей обнаруживаемые различия в частотах генотипов и/или аллеля *CCR5del32* между группами ВИЧ-инфицированных и популяционным контролем статистически незначимы.

Демонстрация достоверности данного феномена требует исследования выборок тем большего размера, чем ниже частота встречаемости аллеля в популяции. В частности, в популяциях Китая, где частота

встречаемости аллеля *CCR5del32* ниже, чем у европейцев, мета-анализ (14 исследований, 1607 инфицированных и 1632 индивида в контрольных группах) не обнаружил значимого протективного эффекта гетерозиготного носительства *wt/del32*: $OR = 1.156$ ($CI_{95\%} = 0.808-1.654$) [60].

Аллель *CCR5del32* встречается преимущественно в популяциях европейского происхождения, при этом частота его в популяциях юга Европы (у испанцев, итальянцев, греков) составляет 5–8% и достигает 15–18% у более северных групп (финны, эстонцы, мордва, татары и др.) [7]. У русских частота аллеля *CCR5del32* довольно высока (от 10 до 17% в разных регионах), тогда как в другой изученной нами группе – калмыки – частота этого аллеля равна 2%. Могут ли различия в частоте протективного аллеля *CCR5del32* играть существенную роль в защите от ВИЧ-инфекции на популяционном уровне или объяснять различия в смертности ВИЧ-инфицированных?

Теоретически популяционные эффекты, обусловленные присутствием делеционного аллеля, можно оценить следующим образом. Пусть q – частота делеционного аллеля и S_{ww} , S_{wd} , S_{dd} – выживаемость инфицированных носителей генотипов *wt/wt*, *wt/CCR5del32*, *CCR5del32/CCR5del32* соответственно. Тогда средняя популяционная выживаемость S_{pop} превышает выживаемость носителей генотипа *wt/wt* на величину

$$\Delta S = S_{pop} - S_{ww} = (1 - q)^2 S_{ww} + 2q(1 - q)S_{wd} + q^2 S_{dd} - S_{ww} \approx 2(S_{wd} - S_{ww})q.$$

В последнем равенстве мы пренебрегли членами порядка q^2 . Таким образом, протективный эффект гетерозиготного носительства аллеля *CCR5del32* (40-процентное снижение смертности инфицированных) при частоте данного аллеля 10% дает 8-процентное снижение смертности в целом для ВИЧ-инфицированных по сравнению с группой, в которой носители аллеля отсутствуют. Аналогично рассчитывается снижение риска инфицирования за счет присутствия в популяции аллеля *CCR5del32*. Если вероятность инфицирования гетерозигот понижена на 13%, то в популяции в целом частота инфицирования снижена на 3.3%. При 15-процентной частоте аллеля снижение инфицируемости составило бы 5.6%, а смертности ВИЧ-инфицированных – 12%.

Таким образом, на популяционном уровне защита от инфицирования ВИЧ и снижение смертности ВИЧ-инфицированных даже в группах с высокой частотой *CCR5del32* (15%) невелика. Помимо *CCR5del32* имеются другие гены, которые влияют на восприимчивость к ВИЧ и ход развития ВИЧ-инфекции [61]

и могут вносить вклад в межпопуляционные различия. Например, русские и калмыки различаются по частотам протективного генотипа *C/C* по полиморфизму в регуляторном участке гена интерлейкина 10 *IL10-592 A/C* (49% у русских Ростовской обл. и 33% у калмыков Элисты) и по частотам протективного аллеля *CCR2-64I* (12% у русских Ростовской обл. и 23% у калмыков Элисты) (собств. неопубл. данные). Однако возможный вклад этих генов в межпопуля-

ционные различия развития ВИЧ-инфекции требует дальнейших исследований, в которых, как надеются авторы, выборки с нозокомиальными инфекциями более не будут доступны. ●

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 07-04-01281а) и Подпрограммы «Генофонды и генетическое разнообразие» Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bridge J., Lazarus J.V., Atun R. // AIDS. 2010. V. 24. Suppl 3. P. S86–S94.
- Покровский В.В., Ерамова И.Ю., Деулина М.О., Липетиков В.В., Слюсарева Л.А., Чемизова Н.М., Савченко С.П. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1990. № 4. С. 17–23.
- Покровский В. Эпидемиология и профилактика ВИЧ-инфекции и СПИДа. М.: Медицина, 1996.
- Restrepo C., Rallón N.I., Carrillo J., Soriano V., Blanco J., Benito J.M. // AIDS Rev. 2011. V. 13. № 1. P. 30–40.
- Martinson J.J., Chapman N.H., Rees D.C., Liu Y.T., Clegg J.B. // Nat. Genet. 1997. V. 16. № 1. P. 100–103.
- Novembre J., Galvani A.P., Slatkin M. // PLoS Biol. 2005. V. 3. № 11. P. e339.
- Balanovsky O., Pocheshkhova E., Pshenichnov A., Solovieva D., Kuznetsova M., Voronko O., Churnosov M., Tegako O., Atramentova L., Lavryashina M., et al. // J. Physiol. Anthropol. Appl. Human Sci. 2005. V. 24. № 4. P. 375–382.
- Huang Y., Paxton W.A., Wolinsky S.M., Neumann A.U., Zhang L., He T., Kang S., Ceradini D., Jin Z., et al. // Nat. Med. 1996. V. 2. P. 1240–1243.
- Liu R., Paxton W.A., Choe S., Ceradini D., Martin S.R. // Cell. 1996. V. 86. P. 367–377.
- Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J., Liesnard C., Farber C.M., Saragosti S., Lapoumeroulie C., Cognaux J., Forceille C. // Nature. 1996. V. 382. P. 722–725.
- Dean M., Carrington M., Winkler C., Huttley G.A., Smith M.W., Allikmets R., Goedert J., Buchbinder S.P., Vittinghoff E., Gomperts E., et al. // Science. 1996. V. 273. P. 1856–1862.
- Marmor M., Sheppard H.W., Donnell D., Bozeman S., Celum C., Buchbinder S., Koblin B., Seage G.R., HIV Network for Prevention Trials Vaccine Preparedness Protocol Team. // J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 2001. V. 27. № 5. P. 472–481.
- Agrawal L., Lu X., Qingwen J., VanHorn-Ali Z., Nicolescu I.V., McDermott D.H., Murphy P.M., Alkhatib G. // J. Virol. 2004. V. 78. P. 2277–2287.
- Oh D.Y., Jessen H., Kücherer C., Neumann K., Oh N., Poggensee G., Bartmeyer B., Jessen A., Pruss A., Schumann R.R., et al. // PloS One. 2008. V. 3. № 7. P. e2747.
- Hendel H., Hénon N., Lebuanec H., Lachgar A., Poncelet H., Caillat-Zucman S., Winkler C.A., Smith M.W., Kenefic L., O'Brien S., et al. // J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 1998. V. 19. P. 381–386.
- Misrahi M., Teglas J.P., N'Go N., Burgard M., Mayaux M.J., Rouzioux C., Delfraissy J.F., Blanche S. // JAMA. 1998. V. 279. P. 277–280.
- Ioannidis J.P., Contopoulos-Ioannidis D.G., Rosenberg P.S., Goedert J.J., De Rossi A., Espanol T., Frenkel L., Mayaux M.J., Newell M.L., Pahwa S.G., et al. // AIDS. 2003. V. 17. P. 1631–1638.
- Mulherin S.A., O'Brien T.R., Ioannidis J.P., Goedert J.J., Buchbinder S.P., Coutinho R.A., Jamieson B.D., Meyer L., Michael N.L., Pantaleo G., et al. // AIDS. 2003. V. 17. P. 377–387.
- Barroga C.F., Raskino C., Fangon M.C., Palumbo P.E., Baker C.J., Englund J.A., Spector S.A. // J. Infect Dis. 2000. V. 182. № 2. P. 413–419.
- Казеннова Е.В., Ааронс Э., Селимова Л.М., Ладная Н.Н., Кравченко А.В., Жемчугов В.Е., Чейнсонг-Попов Р., Вебер Д., Покровский В.В., Бобков А.Ф. // Вопр. вирусологии. 1998. Т. 43. № 1. С. 30–32.
- Шадрина М.И., Копылов В.М., Миросердова О.В., Сломинский П.А., Лимборская С.А. // Генетика. 2000. Т. 36. № 5. С. 718–720.
- Adojaan M., Mölder T., Männik A., Kivisild T., Villems R., Krispin T., Ustav M. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2007. V. 23. № 2. P. 193–197.
- Bobkov A., Cheingsong-Popov R., Garaev M., Rzhaninova A., Kaleebu P., Beddows S., Bachmann M.H., Mullins J.I., Louwagie J., Janssens W., et al. // AIDS. 1994. V. 8. № 12. P. 1649–1655.
- Гафарова И.Э., Шидеева Ж.А., Санджиева Д.Б., Гараев М.М. // Вопр. вирусологии. 2010. Т. 55. № 1. С. 16–22.
- Сломинский П.А., Шадрина М.И., Спицын В.А., Микулич А.И., Хуснутдинова Э.К., Лимборская С.А. // Генетика. 1997. Т. 33. № 11. С. 1596–1598.
- Abramson J.H. // Epidemiol. Perspectives & Innovations. 2004. V. 1. P. 6.
- Du Q., Wang F., Hong W., Liu M., Jin L., Shi H., Lei Z., E.E. // Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2000. V. 6. P. 413–416.
- Magierowska M., Lepage V., Boubnova L., Carcassi C., de Juan D., Djoulah S., El Chenawi F., Grunnet N., Hallo L., Ivanova R., et al. // Immunogenetics. 1998. V. 48. P. 417–419.
- Кожекбаева Ж.М., Бородин Т.А., Боринская С.А., Гусар В.А., Фещенко С.П., Ахметова В.Л., Хусаинова Р.И., Гупало Е.Ю., Спицын В.А., Гречанина Е.Я., и др. // Генетика. 2004. Т. 40. № 10. С. 1394–1401.
- Асеев М.В., Шауи А., Дин М., Баранов В.С. // Генетика. 1997. Т. 33. № 12. С. 1724–1726.
- Libert F., Cochaux P., Beckman G., Samson M., Aksenova M., Cao A., Czeizel A., Claustres M., de la Rúa C., Ferrari M., et al. // Hum. Mol. Genet. 1998. V. 7. № 3. P. 399–406.
- Voevodin A., Samilchuk E., Dashti S. // J. Med. Virol. 1998. V. 55. P. 147–151.
- Limborska S.A., Balanovsky O.P., Balanovskaya E.V., Sломинский П.А., Шадрина М.И., Livshits L.A., Kravchenko S.A., Pampuha V.M., Khusnutdinova E.K., Spitsyn V.A. // Hum. Hered. 2002. V. 53. № 1. P. 49–54.
- Yudin N.S., Vinogradov S.V., Potapova T.A., Naykova T.M., Sitnikova V.V., Kulikov I.V., Khasnulin V.I., Konchuk C., Vloshchinskii P.E., Ivanov S.V., et al. // Hum. Genet. 1998. V. 102. P. 695–698.

34. Рябов Г.С., Казеннова Е.В., Корепанова Л.Б., Мальцева Е.А., Жалнин В.В., Красникова Л.А., Зверев С.Я., Покровский В.В., Бобков А.Ф., Вебер Дж.Н. // *Вопр. вирусологии*. 2002. Т. 42. № 4. С. 13–16.
35. Ryabov G.S., Kazennova E.V., Bobkova M.R., Bobkov A.F. // *Genet. Test*. 2004. V. 8. № 1. P. 73–76.
36. Morawetz R.A., Rizzardi G.P., Glauser D., Rutschmann O., Hirschel B., Perrin L., Opravil M., Flepp M., von Overbeck J., Glauser M.P., et al. // *Eur. J. Immunol.* 1997. V. 27. № 12. P. 3223–3227.
37. Lucotte G. // *Hum. Immunol.* 2001. V. 62. № 9. P. 933–936.
38. Zimmerman P.A., Buckler-White A., Alkhatib G., Spalding T., Kubofcik J., Combadiere C., Weissman D., Cohen O., Rubbert A., Lam G., et al. // *Mol. Med.* 1997. V. 3. P. 23–36.
39. Eugen-Olsen J., Iversen A.K., Garred P., Koppelhus U., Pedersen C., Benfield T.L., Sorensen A.M., Katzenstein T., Dickmeiss E., Gerstoft J., et al. // *AIDS*. 1997. V. 11. P. 305–310.
40. Balotta C., Bagnarelli P., Violin M., Ridolfo A.L., Zhou D., Berlusconi A., Corvasce S., Corbellino M., Clerici M., et al. // *AIDS*. 1997. V. 11. № 10. P. 67–71.
41. Stewart G.J., Ashton L.J., Biti R.A., Ffrench R.A., Bennetts B.H., Newcombe N.R., Benson E.M., Carr A., Cooper D.A., Kaldor J.M. // *AIDS*. 1997. V. 11. № 15. P. 1833–1838.
42. Pastinen T., Liitsola K., Niini P., Salminen M., Syvänen A.C. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1998. V. 14. № 8. P. 695–698.
43. Poljak M., Tomazic J., Seme K., Maticic M., Vidmar L. // *Acta Virol.* 1998. V. 42. № 1. P. 23–26.
44. Alvarez V., López-Larrea C., Coto E. // *Hum. Genet.* 1998. V. 102. № 4. P. 483–486.
45. Ruiz A., Royo J.L., Rubio A., Borrego S., Leal M., Sánchez B., Nuñez-Roldán A., Antiñolo G. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2001. V. 17. № 2. P. 191–193.
46. Barber Y., Rubio C., Fernández E., Rubio M., Fibla J. // *J. Infect. Dis.* 2001. V. 184. № 10. P. 1279–1288.
47. Barabás E., Kemény B., González R., Várkonyi V., Nagy K., Horváth A. // *Int. J. STD AIDS*. 2002. V. 13. № 10. P. 691–697.
48. Philpott S., Burger H., Charbonneau T., Grimson R., Vermund S.H., Visosky A., Nachman S., Kovacs A., Tropper P., Frey H., et al. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999. V. 21. № 3. P. 189–193.
49. Bogner J.R., Lutz B., Klein H.G., Pollerer C., Troendle U., Goebel F.D. // *HIV Med.* 2004. V. 5. № 4. P. 64–72.
50. Liu H., Hwangbo Y., Holte S., Lee J., Wang C., Kaupp N., Zhu H., Celum C., Corey L., McElrath M.J. // *J. Infect. Dis.* 2004. V. 190. № 6. P. 1055–1058.
51. Wasik T.J., Smoleń J., Kruszyński P., Bratosiewicz-Wasik J., Beniowski M. // *Wiad Lek.* 2005. V. 58. № 9–10. P. 500–507.
52. Trecarichi E.M., Tumbarello M., de Gaetano Donati K., Tamburrini E., Cauda R., Brahe C., Tiziano F.D. // *AIDS Res Ther.* 2006. V. 25. P. 3–22.
53. Takácová M., Nogová P., Hábeková M., Staneková D. // *AIDS*. 2008. V. 11. № 15. P. 1833–1838.
54. Parczewski M., Leszczyszyn-Pynka M., Kaczmarczyk M., Adler G., Binczak-Kuleta A., Loniewska B., Boron-Kaczmarzka A., Ciechanowicz A. // *J. Appl. Genet.* 2009. V. 50. № 2. P. 159–166.
55. Egger M., Smith G.D., Schneider M., Minder C. // *Br. Med. J.* 1997. V. 315. P. 629–634.
56. Viera A.J. // *South Med. J.* 2008. V. 101. № 7. P. 730–734.
57. Salkowitz J.R., Purvis S.F., Meyerson H., Zimmerman P., O'Brien T.R., Aledort L., Eyster M.E., Hilgartner M., Kessler C., Konkle B.A., et al. // *Clin. Immunol.* 2001. V. 98. № 2. P. 200–211.
58. Lederman M.M., Alter G., Daskalakis D.C., Rodriguez B., Sieg S.F., Hardy G., Cho M., Anthony D., Harding C., Weinberg A., et al. // *J. Infect. Dis.* 2010. V. 202. Suppl. 3. P. S333–S338.
59. Parczewski M., Bander D., Leszczyszyn-Pynka M., Urbanska A., Kaczmarczyk M., Ciechanowicz A., Boron-Kaczmarzka A. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 7. P. e22215 (1–11).
60. He X.F., Jia Y.J., Su J., Chen Q., Zhu W.C., Yu S.Y. // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2011. V. 31. № 5. P. 791–795.
61. Piacentini L., Biasin M., Fenizia C., Clerici M. // *J. Intern. Med.* 2009. V. 265. № 1. P. 110–124.

УДК 575.22

Генетическое разнообразие и структура неравновесия по сцеплению гена *MTHFR* в популяциях Северной Евразии

Е. А. Трифонова¹, Е. Р. Еремина², Ф. Д. Урнов³, В. А. Степанов^{1,4,5*}¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики СО РАМН, 634050, Томск, Набережная реки Ушайки, 10²Бурятский государственный университет Министерства образования и науки РФ, 670000, Улан-Удэ, ул. Ранжурова, 6а³University of California, Berkley, 313 Richmond, CA 94720, USA⁴Томский государственный университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 36⁵ООО «Геномная диагностика», 634055, Томск, просп. Академический, 17

*E-mail: vadim.stefpanov@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 13.12.2011 г.

РЕФЕРАТ Исследована структура гаплотипов и неравновесия по сцеплению (LD) в локусе метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) в девяти этнотерриториальных выборках Северной Евразии и популяциях из международного проекта НарМар. Полученные данные свидетельствуют о том, что архитектура LD в геноме человека в значительной степени определяется эволюционной историей популяций, тем не менее, результаты гаплотипического и филогенетического анализа указывают на возможность существования общего, «древнего» механизма формирования некоторых паттернов LD. Вариабельность структуры LD и уровень гаплотипического разнообразия гена *MTHFR* в исследованных выборках обуславливают определенный набор tagSNPs (tagging single nucleotide polymorphisms; полиморфизмы, аллельные варианты которых маркируют гаплотипические блоки) с установленной прогностической значимостью для каждой популяции. Полученные в настоящей работе данные представляют, по нашему мнению, значительный интерес в понимании нескольких генетических феноменов: ассоциации межпопуляционных различий в характере LD со структурой наследственной предрасположенности к многофакторным заболеваниям; функциональной значимости и плейотропного «поля действия» гена *MTHFR*. Суммируя результаты проведенного исследования, можно заключить, что анализ генетической вариабельности с акцентом на структуру LD в популяциях человека является мощным инструментом, способным внести большой вклад в такие отрасли медико-биологической науки, как эволюционная биология человека, функциональная геномика, генетика многофакторных заболеваний и фармакогеномика.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА геном, неравновесие по сцеплению, популяции Северной Евразии, метилентетрагидрофолатредуктаза, гаплотип.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МФЗ – многофакторные заболевания; LD – неравновесие по сцеплению; *MTHFR* – метилентетрагидрофолатредуктаза; SNP – однонуклеотидная замена; ГЦ – гомоцистеин.

ВВЕДЕНИЕ

Генетическая вариабельность составляет основу фенотипической изменчивости человека и имеет огромное значение для объяснения индивидуальных различий в подверженности к многофакторным заболеваниям (МФЗ) и определения метаболических путей, вовлеченных в прогрессирование патологических процессов. Наиболее распространенным типом вариабельности генома являются однонуклеотидные замены (SNP). Усилиями международного консорциума по SNP к настоящему моменту в геноме человека выявлено около 10 млн SNPs с плотностью при-

близительно 1 полиморфизм на 300 п.н. [1]. Каждый новый аллель полиморфного варианта возникает на фоне уже существующего гаплотипа, с аллелями, составляющими который, изначально ассоциирован предковый вариант данного маркера. Новые гаплотипы формируются путем накопления новых мутаций и рекомбинации. Совместное наследование аллелей в гаплотипе на популяционном уровне проявляется как неравновесие по сцеплению (LD).

Архитектура LD в геноме человека в настоящее время является предметом оживленных дискуссий и интенсивных исследований [2–7]. Ряд работ по-

казывает, что в геноме можно выделить блоки сцепленных сайтов, не демонстрирующие свидетельств значительной рекомбинации в истории существования нашего вида, отделяемые участками с более интенсивным темпом рекомбинации, так называемыми «горячими точками» [8, 9]. Характер LD в современных популяциях человека формируется в результате комплексного эволюционного процесса, который включает как демографическую историю популяций (изменения эффективной численности, характер подразделенности, миграции), так и генспецифические факторы, например темп мутирования, рекомбинации, давление отбора. Анализ структуры LD позволяет реконструировать демографическую историю современных популяций и занимает центральное место при картировании генов МФЗ [10].

Наряду с полногеномными паттернами LD, изученными в современных широкогеномных исследованиях [11–15], существенный интерес представляет структура LD в отдельных функционально значимых участках генома, в частности в локусах генов, ассоциированных с распространенными болезнями человека. Важность анализа гаплотипической структуры этих областей генома объясняется, с одной стороны, необходимостью выявления функционально значимых вариантов этих генов, обеспечивающих их участие в общей компоненте наследственной подверженности к МФЗ, а с другой – значимостью оценки эволюционно-генетических механизмов генерации генетического разнообразия в этих локусах генома, формировавшихся, вероятно, с учетом действия естественного отбора, генетического дрейфа и миграций и сопоставления генетико-демографических сценариев, полученных при анализе тонкой структуры генов-кандидатов МФЗ с таковыми по данным условно-нейтральных генетических систем и данными полногеномных исследований.

В представленной работе в качестве локуса для изучения структуры LD в популяциях различного этнического происхождения был выбран ген метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), полиморфные варианты которого, по результатам многочисленных исследований, ассоциированы с развитием многих многофакторных состояний (сердечно-сосудистые, онкологические заболевания, дефекты нервной трубки, осложненное течение беременности и ряд других патологических процессов). Фермент метилентетрагидрофолатредуктаза катализирует единственную внутриклеточную реакцию образования 5-метилтетрагидрофолата, необходимого для восстановления гомоцистеина (ГЦ) до метионина. Снижение активности этого фермента, часто обусловленное мутациями в гене *MTHFR*, приводит к накоплению ГЦ и развитию умеренной гипергомоцистеинемии.

Роли генетической варибельности локуса *MTHFR* в развитии многих социально-значимых заболеваний посвящено огромное количество работ, результаты которых указывают на небольшой вклад отдельных SNPs гена *MTHFR* в структуру наследственной предрасположенности к МФЗ и зачастую противоречивы для многих этнических групп. Поскольку одной из потенциально наиболее продуктивных стратегий выявления генетических вариантов, лежащих в основе подверженности к МФЗ, считается анализ структуры LD в области генов-кандидатов и обнаружение связанных с болезнью гаплотипов и их tagSNPs [3, 16, 17], весьма актуальной представляется оценка генетической варибельности генов-кандидатов на уровне SNP и гаплотипов в различных популяционных выборках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Популяции

Данные, представленные в работе, получены при молекулярно-генетическом анализе ДНК индивидов из девяти популяционных выборок, проживающих в различных регионах Северной Евразии и принадлежащих к семи этническим группам (табл. 1). Общая численность суммарной выборки составила 837 человек. Исследованные популяции относятся к двум основным расовым типам населения Евразии (европеоидному и монголоидному) и к четырем лингвистическим семьям (алтайской, палеоазиатской, индоевропейской и уральской). В обследование вошли индивиды неметисированные по крайней мере в трех поколениях. Национальность, родословная и в некоторых случаях принадлежность к родоплеменной группе устанавливались на основании индивидуальных опросников. Выборка тувинцев была собрана в Республике Тува (поселок Бай-Тайга). В Республике Бурятия было обследовано две популяции: буряты из г. Улан-Удэ и пос. Хуромша. Выборка якутов собрана в пос. Дюпся, расположенном на востоке Усть-Алданского улуса Якутии. Среднеазиатские популяции представлены киргизами. Две выборки киргизов представляют население севера (пос. Кегеты, пос. Талды-Су) и юга (г. Ош) Республики Киргизия и относятся к разным родоплеменным группам. Выборка русских представлена жителями г. Томска. Популяция кетов собрана в поселке Келлог Туруханского района Красноярского края, а выборка хантов – в поселке Рускинской Ханты-Мансийского автономного округа.

Кроме того, в качестве объекта для популяционных сравнений были использованы данные по популяциям европеоидов (жители штата Юта, США), китайцев (жители г. Пекин, Китай), японцев (жители

Таблица 1. Лингвистические и антропологические характеристики популяций

Этнос	Популяция, населенный пункт	N	Локализация	Языковая принадлежность, семья/ группа	Расовый и антропологический тип
Тувинцы	пос. Бай-Тайга	134	Республика Тува	Алтайская/ тюркская	Монголоидный (центральноазиатский)
Буряты	г. Улан-Удэ, пос. Хуромша	60 60	Республика Бурятия	Алтайская/ монгольская	Монголоидный (центральноазиатский)
Якуты	пос. Дюпся	81	Республика Саха	Алтайская/ тюркская	Монголоидный (центральноазиатский)
Киргизы	Север (пос. Кегеты, пос. Талды-Су), юг (г. Ош)	85 111	Республика Киргизия	Алтайская/ тюркская	Монголоидный (южносибирский)
Кеты	пос. Келлог	38	Красноярский край, Туруханский район	Палеоазиатская/ кетская	Монголоидный (североазиатский)
Ханты	пос. Рускинской	142	Сургутский район ХМАО	Уральская/ финно-угорская	Уральский (переходный)
Русские	г. Томск	126	Томская область	Индоевропейская/ славянская	Европеоидный (восточноевропейский)

г. Токио, Япония) и йоруба (население Ибадана, Нигерия), полученные в ходе реализации проекта Нар-Мар [11].

Полиморфизмы

В качестве маркеров для изучения паттернов LD были выбраны следующие 12 SNPs гена *MTHFR*: rs3753588, rs2066470, rs17037397, rs7533315, rs4846052, rs1801133 (C677T), rs6541003, rs2066462, rs1801131 (A1298C), rs17375901, rs2274976 (G1793A) и rs1537516 (рис. 1). В табл. 2 представлена краткая характеристика изученных локусов гена *MTHFR*. Десять из 12 SNPs были результатом транзиций (3 A→G и 7 C→T), два – трансверсий (A→C). Выбранные полиморфные варианты относительно равномерно охватывают все участки гена (экзоны, интроны, 3'-нетранслируемые участки), частота минорного аллеля в большинстве локусов составляет не менее 5% (по данным базы NCBI). Генотипирование проводили согласно протоколам, описанным ранее [18–20].

Методы статистической обработки результатов

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакетов статистических программ «Statistica 7.0», «ARLEQUIN» и «Haploview 4.0». Характер распределения полученных данных определяли с использованием критерия Колмогорова–Смирнова, частоты гаплотипов – с помощью EM-алгоритма. LD между парами SNPs оценивали с помощью коэффициента D' , предложенного Левонтином, и коэффициента корреляции r^2 Пирсона. Блочную структуру определяли с использованием алгоритма «Solid spine of LD» [21], предусмотренного программным обеспечением «Haploview 4.1», с заданным порогом $D' \geq 0.8$.

Уровень генетического разнообразия и межпопуляционной дифференциации вычисляли, анализируя молекулярную вариабельность (AMOVA). Селективную нейтральность полиморфизмов изучали с помощью теста Эвенса–Ваттерсона [22]. Роль давления отбора в формировании паттернов LD и уровня генетического разнообразия в популяциях оценивали с использованием стандартных статистических тестов нейтральности Таджимы и Фу [23, 24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическое разнообразие и структура гаплотипов локуса *MTHFR* в популяциях

Генофонд популяций современного человека сформировался в результате последовательных эволюционно-демографических процессов: продолжительного периода эволюции генетического разнообразия в Африке и расхождения популяций при расселении современного человека с частичной изоляцией и снижением интенсивности потока генов обратно пропорционально расстоянию. Популяции в различных географических регионах имеют как общую, так и уникальную эволюционную историю, «отпечатки» которых можно наблюдать в геноме современного человека, в том числе в виде паттернов LD [3, 25–27].

Распределение генотипов, частоты аллелей, наблюдаемая гетерозиготность и уровень значимости соответствия равновесию Харди–Вайнберга исследованных SNPs гена *MTHFR* приведены в табл. 3. Все 12 локусов оказались полиморфными практически во всех изученных популяциях (за исключением rs2066470 в популяции кетов). Частота минорного ал-

Таблица 2. Характеристика исследованных SNPs гена *MTHFR*

№	SNP	Позиция на хромосоме (по данным базы NCBI)	Аллели dbSNP	Предковый аллель	Тип мутации	Локализация в гене <i>MTHFR</i> (по данным базы NCBI)
1	rs3753588	11863904	A/G	G		Интрон 1
2	rs2066470	11863057	C/T	C	Синонимичная (39 Pro/Pro)	Экзон 2
3	rs17037397	11862163	A/C	C		Интрон 2
4	rs7533315	11860683	C/T	C		Интрон 3
5	rs4846052	11857951	C/T	T		Интрон 4
6	rs1801133	11856378	C/T	C	Несинонимичная (222 Val/Ala)	Экзон 5
7	rs6541003	11855867	A/G	G		Интрон 5
8	rs2066462	11854896	C/T	C	Синонимичная (352 Ser/Ser)	Экзон 7
9	rs1801131	11854476	A/C	A	Несинонимичная (429 Ala/Glu)	Экзон 8
10	rs17375901	11852516	C/T	C		Интрон 9
11	rs2274976	11850927	A/G	G	Несинонимичная (594 Gln/Arg)	Экзон 12
12	rs1537516	11847861	C/T	C		3'-нетранслируемая область

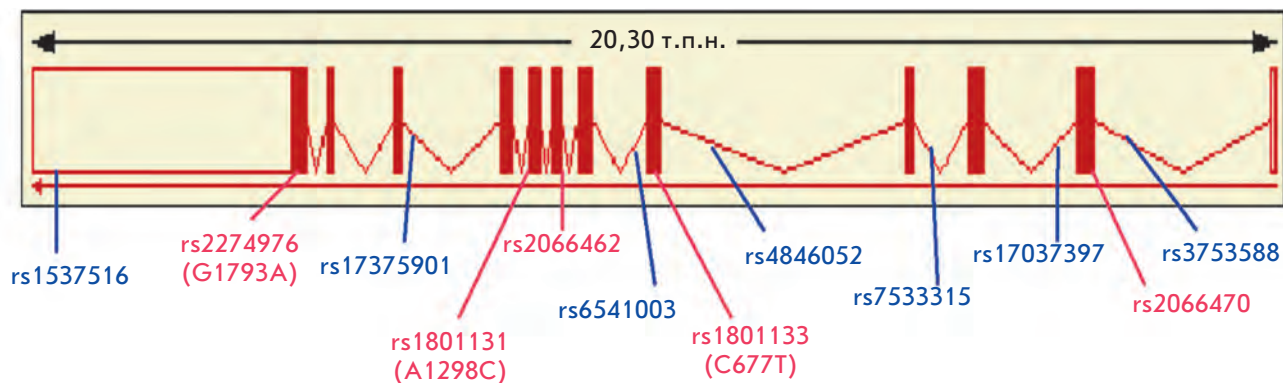


Рис. 1. Локализация исследованных SNP в гене *MTHFR*. Синим цветом показаны полиморфизмы, расположенные в интронах и 3'-нетранслируемой области, красным – в экзонах.

лея варьировала от 0 до 39%, семь SNPs (rs3753588, rs7533315, rs4846052, rs1801133, rs6541003, rs1801131 и rs1537516) встречались с частотой более 5% во всех популяциях. Полученные данные находятся в пределах вариаций частот аллелей и генотипов полиморфизмов гена *MTHFR*, опубликованных и представленных в базах данных европеоидных и монголоидных популяций. Во всех выборках распределение частот генотипов практически всех маркеров соответству-

ет равновесию Харди-Вайнберга (исключение составляют локусы rs17375901, rs2066470, rs3753588, rs2274976 и rs1537516 в популяции бурятов из пос. Хуромша). В большинстве случаев отмечается низкая и средняя гетерозиготность, что согласуется с мировыми данными. Максимальная гетерозиготность по совокупности локусов зафиксирована в популяции якутов (0.28), минимальная – у жителей поселка Хуромша (0.18). Разумеется, приведенные показате-

Таблица 3. Распределение генотипов и минорных аллелей изученных полиморфных вариантов гена *MTHFR* в исследованных выборках

№	Исследованные SNPs	Генотип, аллель	Частота, %								
			Тувицы (N=134)	Киргизы южные (N=111)	Киргизы северные (N=85)	Кеты (N=38)	Буряты г. Улан-Удэ (N=60)	Буряты пос.Хуромша (N=60)	Якуты (N=81)	Ханты (N=142)	Русские (N=126)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	rs3753588	AA	2	1	1	0	0	3	4	2	1
		AG	13	14	22	11	17	5	20	28	18
		GG	85	85	77	89	83	92	76	70	81
		A	8	8	12	5	8	6	14	16	10
		H_e	0.16	0.15	0.23	0.10	0.17	0.13	0.24	0.28	0.18
		p	0.21	0.48	1.00	1.00	1.00	0.008	0.15	1.00	1.00
2	rs2066470	CC	90	85	78	100	83	92	76	79	83
		CT	10	14	18	0	17	5	19	19	16
		TT	0	1	1	0	0	3	5	2	1
		T	5	8	10	0	8	6	14	11	9
		H_e	0.13	0.16	0.20	0	0.17	0.13	0.25	0.20	0.16
		p	1.00	0.53	1.00	0	1.00	0.007	0.05	0.67	1.00
3	rs17037397	AA	0	0	0	0	0	0	3	0	0
		AC	12	11	8	16	20	5	17	26	11
		CC	88	89	92	84	80	95	80	74	89
		A	6	5	4	8	10	3	11	13	6
		H_e	0.12	0.11	0.09	0.17	0.20	0.07	0.20	0.23	0.11
		p	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.24	0.13	1.00
4	rs7533315	CC	55	69	60	68	78	63	63	75	53
		CT	38	29	39	29	19	35	37	23	42
		TT	7	2	1	3	3	2	0	2	5
		T	26	16	21	17	13	19	18	13	26
		H_e	0.38	0.28	0.34	0.31	0.24	0.32	0.31	0.23	0.38
		p	1.00	0.74	0.18	1.00	0.21	0.67	0.06	0.72	0.36
5	rs4846052	CC	46	55	40	55	58	58	40	51	30
		CT	41	42	52	39	36	35	53	39	53
		TT	13	3	8	6	6	7	7	10	17
		T	34	24	34	25	23	24	34	29	43
		H_e	0.45	0.37	0.46	0.38	0.35	0.38	0.45	0.41	0.50
		p	0.33	0.12	0.23	1.00	1.00	0.73	0.13	0.68	0.47
6	rs1801133 (C677T)	CC	67	53	53	79	72	55	61	67	50
		CT	28	37	44	18	25	42	33	29	37
		TT	5	10	3	3	3	3	6	4	13
		T	19	28	24	12	16	24	23	18	31
		H_e	0.32	0.41	0.38	0.24	0.27	0.37	0.36	0.29	0.44
		p	0.26	0.36	0.14	0.41	0.62	0.48	0.75	0.57	0.10
7	rs6541003	AA	43	54	38	53	60	58	37	49	29
		AG	46	43	52	42	35	35	52	40	56
		GG	11	3	10	5	5	7	11	11	15
		G	34	24	36	26	23	24	32	31	43
		H_e	0.45	0.38	0.47	0.39	0.35	0.38	0.47	0.43	0.50
		p	0.85	0.12	0.34	1.00	1.00	0.73	0.47	0.44	0.28

окончание таблицы 3											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
8	rs2066462	CC	94	88	93	89	97	97	89	74	94
		CT	6	12	7	11	3	3	11	26	6
		T	3	6	3	5	2	2	6	13	3
		H_e	0.06	0.12	0.07	0.10	0.05	0.05	0.11	0.23	0.06
		p	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.13
9	rs1801131 (A1298C)	AA	44	62	34	58	60	58	46	51	40
		AC	35	35	54	37	36	35	48	38	48
		CC	21	3	12	5	4	7	6	11	12
		C	38	20	39	24	21	24	30	30	36
		H_e	0.38	0.33	0.49	0.37	0.33	0.38	0.43	0.42	0.47
		p	0.79	0.56	0.25	1.00	1.00	0.73	0.29	0.32	0.69
10	rs17375901	CC	98	96	89	97	98	94	94	94	91
		CT	2	4	11	3	2	3	6	6	9
		TT	0	0	0	0	0	3	0	0	0
		T	1	2	5	1	1	5	3	3	4
		H_e	0.02	0.04	0.11	0.03	0.03	0.11	0.07	0.06	0.09
		p	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.003	1.00	1.00	1.00
11	rs2274976 (G1793A)	AA	0	0	0	0	0	3	3	1	0
		AG	10	30	11	8	17	4	17	23	13
		GG	90	70	89	92	83	93	80	76	87
		A	5	15	5	4	8	5	13	13	6
		H_e	0.11	0.26	0.11	0.10	0.17	0.11	0.20	0.23	0.12
		p	1.00	0.12	1.00	1.00	1.00	0.003	0.24	1.00	1.00
12	rs1537516	CC	84	85	80	89	83	92	80	69	82
		CT	16	14	20	11	17	5	17	29	17
		TT	0	1	0	0	0	3	3	2	1
		T	8	8	10	5	8	6	13	16	10
		H_e	0.15	0.16	0.18	0.13	0.17	0.013	0.20	0.27	0.18
		p	1.00	0.53	1.00	1.00	1.00	0.007	0.24	0.53	0.34
Средняя H_e по 12 локусам			0.21	0.24	0.27	0.19	0.21	0.18	0.28	0.27	0.27
Средняя H_e по 12 локусам			0.23	0.23	0.26	0.19	0.21	0.20	0.27	0.27	0.23

Примечание: N – число индивидов в выборке, H_e – ожидаемая гетерозиготность, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, p – уровень значимости соответствия равновесию Харди–Вайнберга. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые отличия.

ли не отражают уровень гетерозиготности изученных популяций по SNP вообще, в силу малого числа рассматриваемых локусов, а представляют интерес лишь как сведения о степени полиморфизма гена *MTHFR*. Что касается наблюдаемого в нашей работе отклонения от равновесия Харди–Вайнберга, то оно может быть обусловлено смещением оценок частот вследствие небольшого объема выборки. С другой стороны, случаи достоверного отклонения распределения от ожидаемого могут отражать специфику популяционно-генетических процессов в популяции, которая может быть связана как с характеристиками генетико-демографической структуры популяции, так и со сцеплением с функционально значимым локусом, что, на наш взгляд, более вероятно.

Из 12 рассматриваемых SNPs гена *MTHFR* наиболее хорошо изучен полиморфный вариант C677T (rs1801133). Миссенс-мутация C677T (замена цитозина на тимин в положении 677) вызывает замену аланина на валин в каталитическом домене фермента. У гомозигот по полиморфному аллелю активность фермента *in vitro* снижена на 70%, а у гетерозигот – на 35%. Частота мутантного аллеля 677T в популяциях мира колеблется от полного отсутствия у представителей племени денди до 55% у испанцев [28–30]. В России у жителей московского региона частота встречаемости аллеля 677T составляет 29%, у жителей Сибири – 32% [31, 32]. В исследованных нами популяциях частота данного аллеля варьирует от 12% у кетов до 31% в выборке русских.

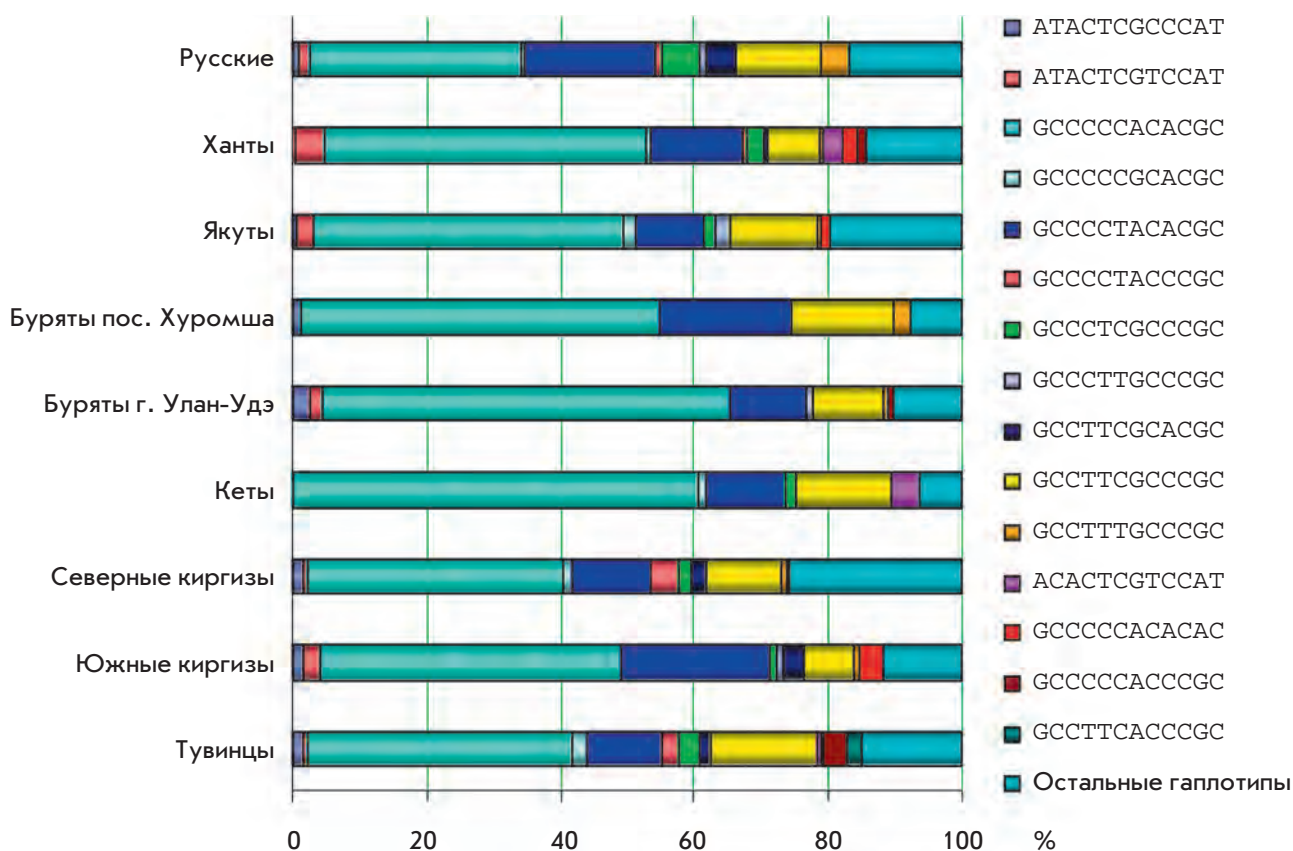


Рис. 2. Распределение гаплотипов в изученных популяциях.

Второй распространенный полиморфизм в гене *MTHFR* – транзикация А1298С (rs1801131), приводящая к замене остатка глутаминовой кислоты на аланин в регуляторном домене фермента. У носителей аллеля 1298С также снижена активность фермента, хотя и не столь значительно, как у носителей аллеля 677Т. У индивидов, являющихся компаунд-гетерозиготами по маркерам С677Т и А1298С, согласно некоторым исследованиям, наблюдается уменьшение активности *MTHFR* на 40–50% и биохимический профиль, схожий с профилем у гомозиготных носителей аллеля 677Т [33]. Минимальная частота аллеля 1298С зафиксирована у жителей Сенегала (4%), максимальная – в популяциях Израиля и Новой Гвинеи (41%) [34, 35]. У жителей России частота данного аллеля варьирует от 24 до 38% [31]. В изученных нами популяциях аллель С встречается с частотой от 20% (у южных киргизов) до 39% (у северных киргизов).

К настоящему времени установлено, что на уровень ГЦ влияет еще один SNP гена *MTHFR* – rs2274976 (G1793A). Этот локус менее изучен, чем С677Т и А1298С. Известно, что частота миссенс-мутации G1793A варьирует от 1.3% у евреев ашкенази до 26.6% у индонезийцев острова Ява [36]. Показано, что гете-

розиготность по сайту G1793A приводит к повышению уровня ГЦ в крови на 40% [37, 38]. В наших популяциях минимальная частота аллеля А составляет 4% в выборке кетов, наибольшая частота данного аллеля (15%) наблюдается в популяции южных киргизов.

В исследованных выборках обнаружено 160 гаплотипов из 4096 теоретически возможных. Максимальное число гаплотипов выявлено в популяции тувинцев (47), минимальное – у кетов (11). В большинстве выборок, за исключением кетов, бурят и южных киргизов, отмечен высокий уровень гаплотипического разнообразия. Если считать каждую мутацию, приводящую к образованию закрепившегося в популяциях полиморфного варианта, уникальным событием, а скорость образования мутаций пренебрежимо малой, то следует постулировать возможность формирования вследствие мутационного процесса лишь 12 гаплотипов. В этом случае существенная часть гаплотипического разнообразия даже в столь физически небольшом участке генома, как локус *MTHFR*, длиной около 20 т.п.н., должна быть сформирована за счет рекомбинационных событий (см. далее).

На рис. 2 представлено распределение гаплотипов, встречающихся с частотой более 2% в изученных по-



Рис. 3. Структура неравновесия по сцеплению в гене *MTHFR* в исследованных популяциях. Цветовая гамма отображает силу сцепления между SNP: ярко-красный – сильное сцепление ($D' = 1$, $LOD > 2$), красный и розовый – значительное сцепление ($D' < 1$, $LOD > 2$), белый – слабое сцепление ($D' < 1$, $LOD < 2$). Ячейка сиреневого цвета обозначает невозможность расчета неравновесия по сцеплению вследствие низкой частоты минорного аллеля полиморфизма ($D' = 1$, $LOD < 2$). Расположение SNP в каждой популяции следующее (слева направо): rs3753588, rs2066470, rs17037397, rs7533315, rs4846052, rs1801133, s6541003, rs2066462, rs1801131, rs17375901, rs2274976, rs1537516, за исключением популяций из проекта ХарМар, где отсутствует полиморфизм rs3753588. В популяции йоруба маркер rs17375901 исключен из анализа, так как является мономорфным.

пуляциях. Гаплотипы с частотой более 5% обозначены как основные. Во всех обследованных популяциях, за исключением русских, выявлены три основных гаплотипа – GCCCCACACGC, GCCCCTACACGC, GCCTTCGCCCGC, частоты которых в сумме составляют более 83% наблюдаемых хромосом в популяциях кетов и бурят, более 61% в остальных выборках.

В исследованных нами популяциях обнаружена различная степень гаплотипического разнообразия, тем не менее, все выборки содержали одинаковые основные гаплотипы, что указывает на возможность общего механизма формирования данных паттернов LD.

Архитектура неравновесия по сцеплению гена *MTHFR* в некоторых популяциях Евразии

На рис. 3 показана структура LD между исследованными локусами гена *MTHFR* в 13 популяционных выборках. Максимальное сцепление между изученными SNP показано для южных киргизов, кетов, китайцев и японцев – в этих выборках все анализируемые аллельные варианты гена *MTHFR* входят в состав одного гаплотипического блока. У европеоидов из проекта ХарМар также наблюдается

один блок, однако он не включает маркеры rs2274976 и rs1537516. Два блока обнаружено у северных киргизов: первый включает три SNP (rs2066470, rs17037397 и rs7533315), второй охватывает участок длиной 10 т.п.н. и содержит восемь SNP. В популяции хантов также выявлено два блока: первый содержит rs3753588, rs2066470 и rs17037397, второй идентичен блоку № 2 у северных киргизов. Сильное сцепление между первыми девятью SNP, составляющими первый блок размером 9 т.п.н., и между rs2274976 и rs1537516, образующими второй небольшой блок, выявлено у бурят пос. Хуромша. В популяции бурят г. Улан-Удэ также обнаружено значительное сцепление между многими полиморфными вариантами, но в структуре LD в этой популяции представлены два других блока (3 и 8 т.п.н.). У русских показаны три блока: первый – из двух близко расположенных SNP (rs3753588 и rs2066470), второй включает пять полиморфизмов – rs7533315, rs4846052, rs1801133, rs6541003 и rs2066462, третий состоит из четырех SNP – rs1801131, rs17375901, rs2274976 и rs1537516.

В популяциях тувинцев и якутов можно выделить четыре небольших гаплотипических блока, состоя-

щих из двух или трех соседних SNPs. В популяции йоруба представлены два блока: первый состоит из 2 т.п.н. и содержит rs2066470, rs17037397 и rs7533315, второй блок достаточно протяженный (7 т.п.н.), он включает четыре локуса (rs2066462, rs1801131, rs2274976 и rs1537516). Таким образом, в исследованных популяциях гаплотипические блоки длиной от 847 п.н. до 16 т.п.н. представлены несколькими (3–6) основными гаплотипами, которые в сумме составляют более 90% наблюдаемых хромосом. Состав и размер блоков варьируют в зависимости от популяционной структуры. Примечательно, что функционально значимые полиморфизмы C677T и A1298C во всех популяциях, кроме южных киргизов, кетов и популяций из проекта НарМар, не сцеплены. Необходимо также отметить, что во многих популяциях наблюдается тесное сцепление между SNPs, образующими второй блок у йоруба.

На сегодняшний день степень гаплотипического разнообразия и протяженность блоков сцепления в разнообразных участках генома определены во многих популяциях человека [39, 40]. Обнаружена большая изменчивость гаплотипической структуры, которая значительно отличается при переходе от одного геномного региона к другому, часто перемежаясь регионами низкого уровня LD. Размеры гаплотипических блоков варьируют от 1 до 100 и более т.п.н. [9]. Некоторые авторы сообщают о согласованности пространственного размещения гаплотипических блоков в нескольких регионах генома человека, указывая на возможность общего механизма образования этих блоков в различных популяциях как вероятной причины данного феномена [3, 41]. Описана также дихотомия африканцы/неафриканцы в нескольких сегментах генома человека [42, 43], где гаплотипические блоки имеют большую протяженность в неафриканских популяциях (> 44 т.п.н.), чем у населения Африки (>22 т.п.н.) [9]. Обнаружены паттерны мейотической рекомбинации, которые подтверждают, что регионы низкого уровня LD, соответствующие регионам с высокими показателями рекомбинации, ограничивают гаплотипические блоки [10, 44]. В рамках интенсивного изучения рекомбинации в геноме человека оценивали также взаимосвязь между частотой рекомбинаций, структурой хроматина и различными структурными и функциональными компонентами ядра. Этот анализ показал, что различные потенциальные факторы как локальные (нуклеотидная последовательность ДНК, структура хроматина), так и несвязанные непосредственно со структурой точки рекомбинации, могут повлиять на показатели рекомбинации специфического хромосомного сегмента. Существует предположение, что рекомбинация является основной причиной об-

разования блоков сцепления вследствие разрушения протяженных гаплотипов в хромосомных регионах со сравнительно высокой рекомбинацией. Доказательством этой гипотезы служит похожая структура LD в нескольких регионах генома в различных популяциях [45–47]. Наряду с этим существуют данные, свидетельствующие о значимых межпопуляционных различиях в степени и характере LD в одном и том же участке генома [10, 48–50]. Эти результаты указывают на то, что характер LD, выявленный в конкретной популяции или выборке, вероятно, не может автоматически экстраполироваться на другие популяции, по крайней мере, в некоторых участках генома. Маловероятно, что одна общая карта неравновесия по сцеплению в геноме окажется полезной при выборе генетических маркеров для ассоциативных исследований во многих популяциях, поскольку нельзя игнорировать взаимодействие между различными популяционно-специфическими факторами и геном-специфическими механизмами при формировании структуры LD.

В настоящей работе получено подтверждение популяционно-специфического характера формирования паттернов LD. Наиболее сильное сцепление (все SNPs входят в состав одного блока) между исследованными локусами обнаружено в популяциях кетов, южных киргизов, китайцев и японцев. Тесное сцепление наблюдалось также у бурят. Можно предложить два объяснения наблюдаемому сохранению структуры и протяженности блока: недавнее происхождение от общих предков или позитивный отбор, который часто приводит к увеличению размера блока, содержащего полезный аллель [51]. Поскольку у кетов и бурят выявлено минимальное число гаплотипов среди всех исследованных популяций, есть вероятность, что в данном случае имел место эффект основателя. Однако на увеличение структуры LD влияет и ряд других факторов [49] (генетическая изоляция, подразделенность или смешение популяций, балансирующий отбор, эффект «горлышка бутылки», небольшой размер популяции и другие причины), действие которых на некоторые популяции также нельзя исключить.

Показано, что протяженность паттернов LD в геноме человека определяет потенциал и дизайн ассоциативных исследований, использующих SNP для картирования генов, лежащих в основе сложных признаков. Текущая оценка числа маркеров, необходимых для основанного на LD геномного сканирования различных популяций, варьирует от 120000 до нескольких миллионов и свидетельствует об огромной стоимости генотипирования и возможных проблемах статистических выводов. Предполагается, что в популяциях с высокой степенью LD ко-

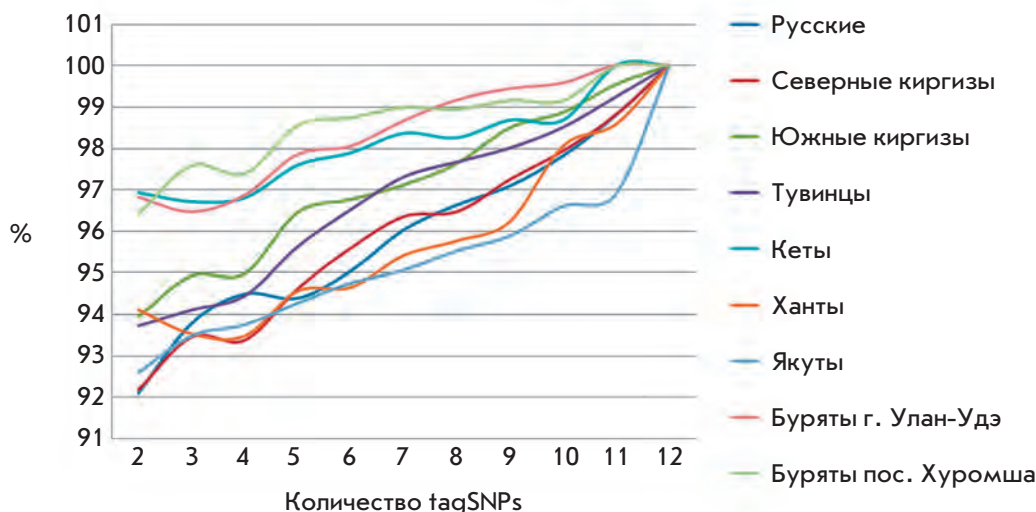


Рис. 4. Вариабельность точности прогноза набора tagSNP гена *MTHFR* в зависимости от их количества и популяционной выборки.

личество маркеров, необходимых для картирования МФЗ, существенно снизится [52].

Выбор tagSNPs гена *MTHFR*

По оценкам различных ученых геном человека содержит более 7.5 млн распространенных SNPs с частотой минорного аллеля (MAF) не менее 5% [21, 53], которые объясняют часть наследственного риска развития многих МФЗ. В настоящее время одной из наиболее продуктивных стратегий создания панели генетических маркеров для анализа ассоциаций с МФЗ является выбор tagSNPs с целью расширения «генетического охвата» [54]. В данном случае «генетический охват» определяется как доля набора всех распространенных SNPs с MAF 5%, находящихся в пороговой корреляции, по крайней мере, с одним SNP из заданного массива полиморфизмов [55]. Подход с использованием tagSNPs имеет преимущества в связи с известными на сегодняшний день знаниями о блочной структуре LD организации генома человека. Кроме того, данная стратегия существенно редуцирует силы и средства, необходимые для генотипирования [53, 56]. Исходя из несомненной потенциальной пользы выбора tagSNPs для ассоциативных исследований, предлагается эффективно идентифицировать их посредством различных алгоритмов.

В данной работе при установлении tagSNPs использовали два метода – «STAMPA» и «Tagger». «STAMPA» использует для анализа информацию о генотипах и не требует сведений о гаплотипах и блочной архитектуре исследуемого геномного региона [57]. Этот алгоритм основан на гипотезе о том, что корреляция между SNPs имеет тенденцию к снижению с увеличением физического расстояния между ними, а аллельный вариант SNP может быть

определен на основе знания аллельных вариантов ближайших tagSNPs с каждой стороны. Во всех популяциях уже при двух выбранных tagSNPs гена *MTHFR* достигается прогностическая ценность более 90% (рис. 4). Возможно, это обусловлено небольшим размером гена и физически близким расположением рассматриваемых полиморфных сайтов. Однако для достижения точности прогноза 99–100% требуется значительно увеличить количество tagSNPs, что, на наш взгляд, является существенным недостатком данного алгоритма.

Также в представленной работе tagSNPs гена *MTHFR* определяли с помощью приложения «Tagger», предусмотренного программным обеспечением «HaploView» [21]. В данном методе использовался алгоритм «Aggressive tagging», основанный на выявлении tagSNP в двух и трех маркерных гаплотипах, в пределах которых все входящие полиморфные варианты должны находиться в состоянии прочного сцепления ($LOD > 3$) друг с другом [26]. TagSNPs, выявленные при помощи описанного алгоритма, представлены в табл. 4.

Предсказательная способность данного набора tag-меток относительно всего массива исследованных полиморфизмов составляет 100%. Согласно полученным результатам, при заданном пороге прогностической ценности в различных популяциях наблюдаются неодинаковые наборы tagSNPs, что, вероятно, обусловлено варьированием структуры LD и гаплотипического разнообразия гена *MTHFR* в выборках. Подтверждением этого служит статистически значимая корреляция между гаплотипическим разнообразием и вариабельностью числа tagSNPs ($r^2 = 0.85$; $p < 0.01$). Вопрос о возможности «переноса» tagSNPs с одной популяции на другую доволь-

Таблица 4. TagSNPs гена *MTHFR*, идентифицированные в программе «Tagger»

Популяция	Число tagSNP	SNP гена <i>MTHFR</i>											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Русские	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Северные киргизы	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Южные киргизы	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Тувинцы	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Кеты	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ханты	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Якуты	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Буряты г. Улан-Удэ	8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Буряты пос. Хуромша	7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Примечание: использована следующая нумерация SNP: 1 – rs3753588, 2 – rs2066470, 3 – rs17037397, 4 – rs7533315, 5 – rs4846052, 6 – rs1801133, 7 – rs6541003, 8 – rs2066462, 9 – rs1801131, 10 – rs17375901, 11 – rs2274976, 12 – rs1537516. Серым фоном выделены tagSNP гена *MTHFR*.

но важен, так как анализ ассоциаций с использованием tagSNPs, идентифицированных на основании данных проекта НарМар, весьма актуален. В серии недавно выполненных исследований показана достаточно высокая прогностическая ценность наборов tagSNPs в нескольких регионах генома, выбранных для CEU, CHB и JPT, применительно к ряду европеоидных и монголоидных популяций [58–60]. Тем не менее обнаружено, что уровень экстраполяции tagSNP снижается при использовании набора tagSNPs, найденных для CEU, в ассоциативных исследованиях в африканских и некоторых изолированных европеоидных популяциях [26, 61, 62]. Наряду с этим показано, что наиболее универсальные tagSNPs, обеспечивающие максимальный «генетический охват» в других популяциях, идентифицируются у йоруба вследствие минимальной силы LD в этой выборке [53].

В рамках нашей работы проведен сравнительный анализ мощности алгоритмов «STAMPA» и «Tagger» в зависимости от уровня прогностической оценки. Как видно из табл. 5, при уровне прогноза 90–95% минимальное число tagSNPs определяется посредством алгоритма «STAMPA», а при предсказательной точности 98–100% более эффективен метод «Tagger».

Использование tagSNPs как средства, эффективно отражающего генетическое разнообразие, на сегодняшний день широко распространено в различных генетических исследованиях. Тем не менее качество выбранных tagSNPs зависит от исходного массива, в котором они охарактеризованы. Если изначально плотность маркеров слишком редкая, то выбранный tagSNP «захватит» меньше информации, чем требу-

ется для анализа. Необходимая плотность маркеров в исходном массиве данных варьирует в различных участках генома в зависимости от ряда показателей, таких, например, как уровень рекомбинации, структура LD, частоты SNP, характер мутации и демографическая история населения [17].

Филогенетический анализ взаимоотношений гаплотипов локуса *MTHFR* и оценка селективной нейтральности изученных полиморфизмов

В данной работе филогенетический анализ взаимоотношений гаплотипов, определяемых по диаллельным маркерам и встречающихся с частотой более 0.1% в суммарной выборке, проводили, конструируя филогенетические деревья (сети) гаплотипов по алгоритму медианных сетей, реализованному в программе «Network». В качестве предкового гаплотипа рассматривали гаплотип, состоящий из предковых аллелей (информация взята из базы данных NCBI). Полученные результаты свидетельствуют о схождении всех гаплотипов, наблюдаемых в изученных популяциях человека, к одному общему предковому варианту, встречающемуся с частотой около 12% у йоруба и 1% в популяциях русских и северных киргизов (гаплотип 10 на рис. 5), что свидетельствует в пользу теории недавнего африканского происхождения современного человека. Подтверждает эту гипотезу и значительная частота у йоруба гаплотипов № 4 и 7, наиболее близких к предковому варианту.

Все наблюдаемые гаплотипы находятся в пределах шести мутационных шагов от общего предка и разбиваются на три основных кластера – А, В и С, формирующихся из гаплотипов ССТТСГСАСГС, СССТСГСССГС и СССТСАСАСГС (№ 4, 5 и 7 со-

Таблица 5. Сравнительная характеристика алгоритмов определения tagSNPs «STAMPA» и «Aggressive tagging»

Популяция	Точность прогноза 90%		Точность прогноза 95%		Точность прогноза 98%		Точность прогноза 100%		Гаплогенетическое разнообразие	Число блоков
	STAMPA	Tagger	STAMPA	Tagger	STAMPA	Tagger	STAMPA	Tagger		
	Число tagSNP гена <i>MTHFR</i>									
Русские	2	8	6	9	12	9	10	9	0.69	3
Северные киргизы	2	10	6	11	12	11	10	11	0.77	2
Южные киргизы	2	7	4	8	12	8	9	8	0.62	1
Тувинцы	2	10	5	11	12	11	9	11	0.82	4
Кеты	2	7	2	8	12	8	10	8	0.49	1
Ханты	2	8	7	9	12	9	10	9	0.78	3
Якуты	2	9	7	10	12	10	12	10	0.72	4
Буряты г. Улан-Удэ	2	7	2	8	12	8	5	8	0.59	3
Буряты пос. Хуромша	2	6	2	7	12	7	5	7	0.55	2

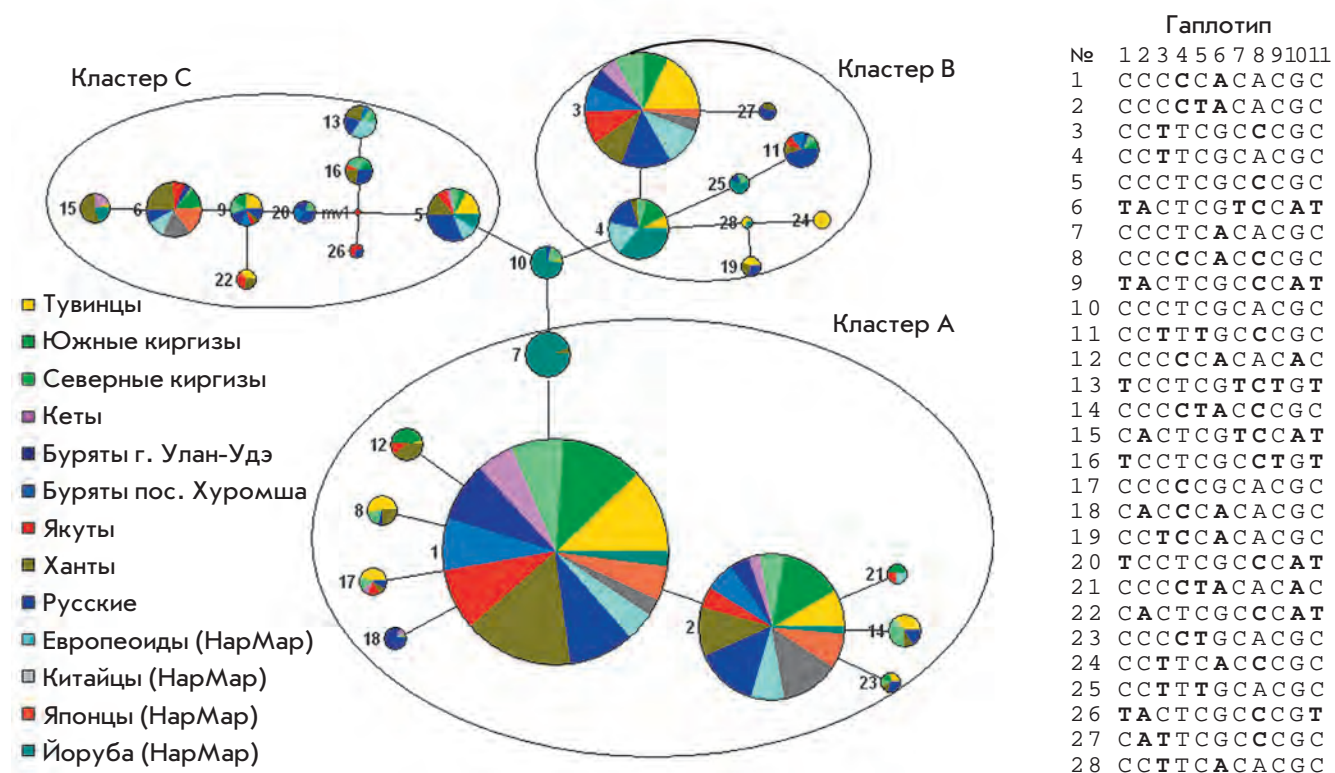


Рис. 5. Медианное дерево гаплотипов, встречающихся с частотой более 0.1% в суммарной выборке. Жирным выделены мутантные аллели, предковый гаплотип обозначен № 10. Диаметр узла отражает частоту гаплотипа в суммарной выборке. Нумерация SNP в гаплотипах: 1 – rs2066470, 2 – rs17037397, 3 – rs7533315, 4 – rs4846052, 5 – rs1801133, 6 – rs6541003, 7 – rs2066462, 8 – rs1801131, 9 – rs17375901, 10 – rs2274976, 11 – rs1537516.

ответственно, рис. 3). Кластер А представлен 10 гаплотипами, два из которых (№ 1, 2) наиболее распространенные (их суммарная частота составляет более 50% от частоты всех гаплотипов в суммарной выборке) и выявляются во всех изученных популяциях. Необходимо отметить, что структура дерева в данном кластере носит ярко выраженный звездообразный характер, что, очевидно, указывает на резкую экспансию численности в демографической истории населения. Кластер В включает восемь гаплотипов, в том числе гаплотип № 3, третий по частоте встречаемости и представленный во всех популяциях, за исключением йоруба. Примечательно, что гаплотипы № 8, 12, 17, 18, 21, 14, 23, 27, 11, 24, 19 кластеров А и В, расположенные на концах ветвей филогенетического дерева, встречаются только в популяциях Северной Евразии и предположительно возникли недавно. Гаплотипы кластера С содержат большое число мутантных аллелей, они образовались, вероятно, с участием рекомбинационных событий.

Поскольку темп мутирования SNP и их разнообразие, наблюдаемое в современных популяциях, поддаются оценке, можно рассчитать время происхождения данной гаплотипической линии. Известно, что оценки разнообразия, основанные на филогении нуклеотидных последовательностей ДНК, не зависят от демографических процессов [63] и пригодны для выявления эволюционного «возраста» генетических линий. При этом под возрастом понимают время коалесценции («схождения» к общему предку), или, другими словами, время генерации наблюдаемого разнообразия. Учитывая эти соображения, в качестве мутационного шага для оценки времени коалесценции гаплотипов рассматривали изменения аллелей одного SNP в одном локусе. Всем полиморфным вариантам задавали одинаковый темп мутирования, составляющий 1×10^{-8} на локус на поколение [64]. Время одного поколения считали равным 20 годам. Время коалесценции гаплотипов оценивали посредством программы «Network». В целом возраст генерации разнообразия, определенный по 12 SNPs гена *MTHFR*, составил 314000 ± 135000 лет. Для оценки точности данного результата были проанализированы медианные деревья гаплотипов, полученные при «разбиении» гена *MTHFR* на два блока (первый включает rs3753588, rs2066470, rs17037397, rs7533315, rs4846052, rs1801133, rs6541003, второй – rs2066462, rs1801131, rs17375901, rs2274976, rs1537516). Такой анализ был проведен в связи с тем, что в большинстве популяций, а также у йоруба указанные участки гена *MTHFR* входят в состав разных блоков LD. Тем самым независимый филогенетический анализ двух блоков гена *MTHFR* может быть более устойчивым к возможным ошибкам, привносимым за счет рекомбинации. В итоге время коалесценции

первого блока оказалось равным 350000 ± 188000 лет, возраст предкового гаплотипа второго блока оценивается в 306000 ± 188000 лет.

Хотя проведенный филогенетический анализ является достаточно мощным и продуктивным для характеристики эволюционных взаимоотношений между гаплотипами, следует отметить, что абсолютные оценки времени коалесценции (т.е. времени, выраженному в годах) следует интерпретировать с осторожностью, поскольку ключевые параметры, на которых строятся эти оценки, – темп мутирования и отсутствие рекомбинации в анализируемом участке генома.

Согласно результатам ряда исследований [65, 66], сравнительно недавняя и быстрая экспансия человека из Африки оставила существенный «отпечаток» в нашем геноме, сформировав структуру генетических различий в популяциях человека, обладающую, в том числе и биомедицинской значимостью. Необходимо отметить, что вариабельность генома, обуславливающая фенотипические различия между двумя индивидами, составляет всего 0.1%. Фактически, большинство этих изменений в ДНК должно быть эволюционно нейтральным, но, тем не менее, выявлено большое число полиморфизмов, влияющих на фенотип, которые могут быть объектами отбора или подвергнуться ему в дальнейшем [65].

При анализе селективной нейтральности полиморфизмов гена *MTHFR* с помощью теста Эвенса–Ваттерсона отклонение от нейтральности обнаружено только у rs4846052 и rs6541003 в выборках русских (наблюдаемый критерий F для теста Эвенса–Ваттерсона составил 0.99 ($p = 0.039$) и 0.84 ($p = 0.041$) соответственно) и европеоидов из проекта ХарМар ($F = 0.79$ ($p = 0.021$) и $F = 0.98$ ($p = 0.030$) соответственно). Все три функционально значимых SNPs, обуславливающие повышение уровня ГЦ в крови, оказались селективно нейтральными. Вероятно, это объясняется тем, что даже некоторое изменение фенотипа может быть селективно нейтральным, если не влияет на репродуктивную эффективность [67]. Тем не менее существуют данные о селекции аллеля 677Т в испанской популяции, основанные на изучении изменения распределения частот генотипов и аллелей полиморфизма С677Т в течение XX века. В популяции отмечен рост числа индивидов с генотипом 677ТТ, обусловленный повышением жизнеспособности носителей аллеля 677Т на ранних стадиях эмбриогенеза, вследствие приема многими женщинами фолиевой кислоты в первом и втором триместрах беременности [68]. Кроме того, селективную значимость аллеля Т подтверждают результаты анализа распределения частот аллелей, генотипов и гаплотипов полиморфизмов С677Т и А1298С гена *MTHFR* в популяциях Израиля, Японии и Африки, согласно

которым аллель 677Т обнаруживается в гаплотипах, имеющих селективное преимущество [69].

Известно, что частота аллеля 677Т в мировых популяциях очень гетерогенна: от полного отсутствия у представителей африканских племен до 55% у испанцев [28–30]. Более того, наблюдается градиент частоты данного аллеля с севера на юг Европы [70]. Показано, что в Северной Америке частота гомозигот 677ТТ увеличивается в направлении от Западной Канады (Альберта) до юго-востока США (Атланта) и достигает своего пика в Мексике [71]. Механизмы генерации этого градиента достоверно не установлены, однако, существуют по крайней мере три гипотезы, которые базируются на предположении, что высокая частота аллеля 677Т обусловлена действием естественного отбора. Первая гипотеза постулирует, что во время голода уменьшение активности МТНFR приводит к снижению реметилирования гомоцистеина, и таким образом сберегает одноуглеродные радикалы тетрагидрофолатного метаболизма для жизненно важной синтеза ДНК и РНК. Согласно другой гипотезе, у носителей мутантного аллеля меньше вероятность заболеть раком толстой кишки, в результате чего частота мутации в популяции может постепенно возрастать [18]. Третья гипотеза в качестве основного фактора накопления гомозигот 677ТТ в популяции рассматривает ген-средовые взаимодействия между МТНFR и содержанием фолиевой кислоты. Последняя теория нашла свое подтверждение в ряде экспериментальных работ [34, 70, 71].

Роль давления отбора в формировании паттернов LD и уровня генетического разнообразия в популя-

циях оценивали с использованием стандартных статистических тестов нейтральности Таджимы и Фу [23, 24]. Значение критерия *D* Таджимы оказалось отрицательным во всех исследованных популяциях, но статистически незначимым. Значение критерия *F_s* теста Фу было отрицательным и статистически значимым в популяциях тувинцев (*F_s* = -11.28, *p* < 0.01), северных киргизов (*F_s* = -24.15; *p* < 0.00001), якутов (*F_s* = -19.76, *p* < 0.00001) и хантов (*F_s* = -10.31, *p* < 0.01), что свидетельствует о возможном действии отрицательного отбора на данный участок генома в этих популяциях либо о популяционной экспансии. Однако смешение данных популяций с соседними также могло привести к увеличению разнообразия ДНК, а вместе с этим и значения критерия *F_s*.

В целом полученные данные свидетельствуют о вероятном действии стабилизирующего отбора на локусы rs4846052 и rs6541003 у европеоидов из проекта Хар-Мар и русских г. Томска и о возможном действии отрицательного отбора на определенные гаплотипы гена *MTHFR* в популяциях тувинцев, северных киргизов, якутов и хантов. Необходимо отметить, что эти четыре популяции характеризуются наиболее высоким уровнем гаплотипического разнообразия (более 70%) и низким уровнем LD среди всех исследованных групп.

Генетическая дифференциация и взаимоотношения между исследованными популяциями

Данные о степени генной дифференциации (*F_{st}*) в суммарной выборке по каждому из выбранных маркеров представлены на рис. 6. Необходимо отметить, что все

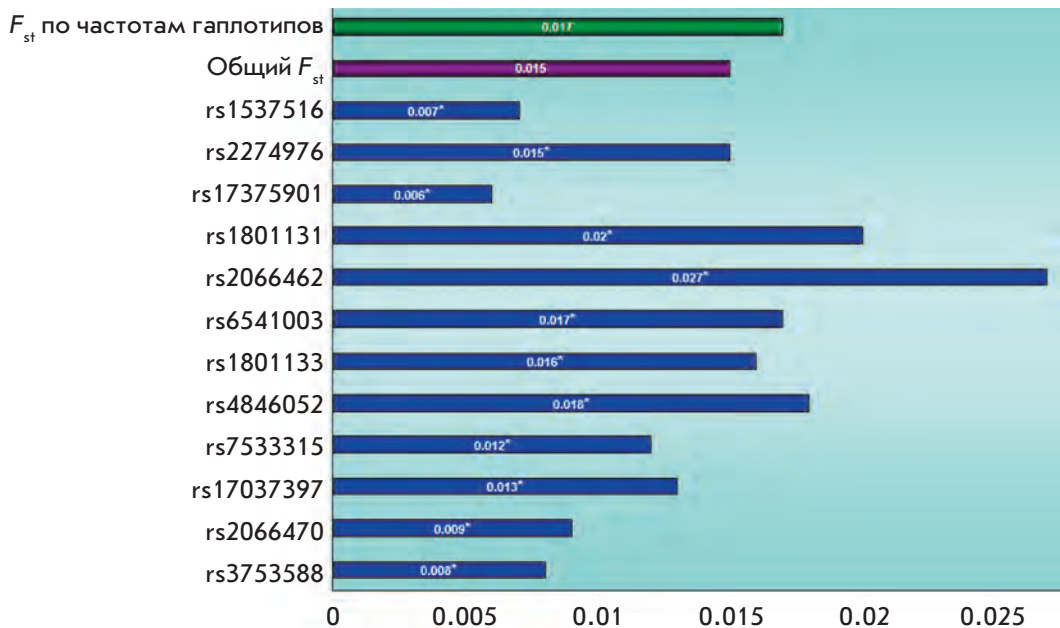


Рис. 6. Общая генетическая дифференциация суммарной выборки по исследованным полиморфизмам гена *MTHFR*. *Статистически значимые различия (*p* < 0.05).

изученные полиморфные варианты показали статистически значимую дифференциацию. Показано, что наибольший вклад в межпопуляционное разнообразие вносят различия в частотах аллелей локусов rs4846052, rs1801133, rs6541003, rs2066462, rs1801131 и rs2274976. Наименьшая же степень межпопуляционного разнообразия характерна для rs17375901. Уровень генетической дифференциации изученных популяций по частотам аллелей 12 исследованных SNPs гена *MTHFR* составил 0.015, а по частотам гаплотипов 0.017. Оценка проводилась с помощью коэффициента F_{st} .

Филогенетический анализ генетического родства популяций проводили на массиве данных для 13 популяций. Полученная дендрограмма генетических взаимоотношений популяций показана на рис. 7. На представленном дереве можно выделить два основных кластера. Первый включает йоруба, европеоидов НарМар, русских, северных киргизов, тувинцев и якутов; второй – хантов, кетов, бурятов, южных киргизов, японцев, китайцев. Данный подход выявляет существенные различия генофондов европеоидных (русские, европеоиды НарМар) и монголоидных (японцы, китайцы, буряты, южные киргизы) популяций, а также тесное генетическое родство между йоруба и европеоидами НарМар, китайцами и японцами. Интересным представляется факт расположения северных и южных киргизов в разных кластерах на значительном генетическом расстоянии. Разрешающая способность дерева, построенного всего по 11 локусам, недостаточна, чтобы делать какие-то определенные выводы о деталях генетических взаимоотношений между исследованными популяциями, а свидетельствует лишь о степени генетических различий между ними по локусу *MTHFR*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение архитектуры неравновесия по сцеплению (LD) локуса *MTHFR* в девяти популяционных выборках, проживающих на территории Северной Евразии, базировалось на концепции блочной структуры генома человека. В качестве объекта для популяционных сравнений использованы данные по популяциям европеоидов, китайцев, японцев и йоруба, полученные в ходе реализации проекта НарМар.

В результате проведенной работы выявлена популяционная специфичность структуры LD гена *MTHFR* в различных этнотерриториальных группах Северной Евразии. Наряду с этим обнаружено сходство в архитектуре LD среди некоторых популяций, свидетельствующее о роли эволюционной истории в организации блочной структуры LD.

Нами показана различная степень гаплотипического разнообразия в исследованных популяциях,

тем не менее, во всех выборках, за исключением йоруба, найдены идентичные основные гаплотипы, что указывает на возможность общего механизма формирования паттернов LD гена *MTHFR*. Проведенный филогенетический анализ гаплотипов показывает схождение всех гаплотипов, наблюдаемых в изученных популяциях, к одному общему предковому варианту, свидетельствует о значительной роли рекомбинации в генерации генетического разнообразия локуса *MTHFR* и возможности резкой экспансии численности населения. Возраст генерации разнообразия по 12 SNP гена *MTHFR* составил 314000 ± 135000 лет.

Также в представленной работе получены данные, подтверждающие действие стабилизирующего отбора на локусы rs4846052 и rs6541003 у европеоидов НарМар и влияние отрицательного отбора на определенные гаплотипы гена *MTHFR* в популяциях тувинцев, северных киргизов, якутов и хантов, характеризующихся наиболее высоким уровнем гаплотипического разнообразия (более 70%) и низким уровнем LD среди всех исследованных групп. Все изученные SNPs гена *MTHFR* показали достоверную дифференциацию. Данные по отдельным локусам демонстрируют, что наибольший вклад в межпопуляционное разнообразие вносят различия по частоте



Рис. 7. Дендрограмма генетических взаимоотношений между исследованными популяциями. Длина ветвей филогенетического дерева соответствует генетическим расстояниям.

там аллелей локусов rs4846052, rs1801133, rs6541003, rs2066462, rs1801131 и rs2274976. Наименьшая же степень межпопуляционного разнообразия характерна для маркера rs17375901, являющегося мономорфным у йоруба.

Таким образом, архитектура LD в геноме человека, в частности в локусе *MTHFR*, носит популяционно-специфический характер и в значительной степени определяется эволюционной историей популяции. Очевидно, что при анализе структуры LD и выборе tagSNP при проведении генетического картирования широко распространенных заболеваний как в полногеномном масштабе, так и при ассоциативных исследованиях, когда вариант, связанный с болезнью, выявляется по сцеплению с близлежащими сайтами

в относительно узком регионе генома, необходимо учитывать значительную этноспецифическую вариабельность гаплотипических блоков. Дальнейшее изучение характера генетического разнообразия и неравновесия по сцеплению в геноме в конкретных географических, этнических или популяционных группах позволит реконструировать генетическую историю популяций, выявить следы действия естественного отбора, связанного с адаптивной изменчивостью. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК № П321).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gamazon E.R., Zhang W., Dolan M.E., Cox N.J. // PLoS One. 2010. V. 5. № 2. e9366.
- Zhao H., Nettleton D., Dekkers J.C.M. // Genet. Res. 2007. V. 89. P. 1–6.
- Slatkin M. // Genetics. 2008. V. 9. P. 477–485.
- Altshuler D., Daly M.J., Lander E.S. // Science. 2008. V. 322. P. 881–888.
- Lambert C.A., Tishkoff S.A. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 2009. V. 74. P. 395–402.
- Neale B.M. // Cold Spring Harbor Protoc. 2010. V. 3. P. 74
- Huang Y.T., Chang C.J., Chao K.M. // Curr. Drug. Metab. 2011. V. 12. № 5. P. 498–506.
- Daly M.J., Rioux J.D., Schaffner S.F., Hudson T.J., Lander E.S. // Nature. 2001. V. 29. P. 229–232.
- Gabriel S.B., Schaffner S.F., Nguyen H., Moore J.M., Roy J., Blumenstiel B., Higgins J., DeFelice M., Lochner A., Faggart M., et al. // Science. 2002. V. 296. P. 2225–2229.
- Jeffreys A.J., Kauppi L., Neumann R. // Nat. Genet. 2001. V. 29. P. 217–222.
- The International HapMap Consortium. // Nature. 2007. V. 449. P. 851–862.
- Shriner D., Adeyemo A., Gerry N.P., Herbert A., Chen G., Doumatey A., Huang H., Zhou J., Christman M.F., Rotimi C.N. // PLoS One. 2009. V. 4. № 12. e8398.
- Joubert B.R., North K.E., Wang Y., Mwapasa V., Franceschini N., Meshnick S.R., Lange E.M. // J. Hum. Genet. 2010. V. 55. № 6. P. 366–374.
- O'Dushlaine C.T., Morris D., Moskvina V., Kirov G., Consortium I.S., Gill M., Corvin A., Wilson J.F., Cavalleri G.L. // Eur. J. Hum. Genet. 2010. V. 18. № 11. P. 1248–1254.
- Dumitrescu L., Carty C.L., Taylor K., Schumacher F.R., Hindorf L.A., Ambite J.L., Anderson G., Best L.G., Brown-Gentry K., Bůžková P., et al. // PLoS Genet. 2011. V. 7. № 6. e1002138.
- Crawford D.C., Nickerson D.A. // Annu. Rev. Med. 2005. V. 56. P. 303–320.
- Zhang R., Li X., Jiang Y., Liu G., Li C., Zhang F., Xiao Y., Gong B. // Science in China Ser. 2009. V. 52. № 2. P. 163–172.
- Frosst P., Blom H.J., Milos R., Goyette P., Sheppard C.A., Matthews R.G., Boers G.J., den Heijer M., Kluijtmans L.A., van den Heuvel L.P., et al. // Nat. Genet. 1995. V. 10. P. 111–113.
- Friedman G., Goldschmidt N., Friedlander Y. // J. Nutr. 1999. № 129. P. 1656–1661.
- Трифоновна Е.А., Спиридонова М.Г., Пузырёв В.П., Степанов В.А. // Мед. генетика. 2009. № 1. С. 39–47.
- Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. // Bioinformatics. 2005. № 21. P. 263–265.
- Watterson G.A. // Theor. Popul. Biol. 1975. V. 7. P. 256–276.
- Tajima F. // Genetics. 1989. V. 123. P. 585–595.
- Fu Y.X. // Genetics. 1997. V. 147. P. 915–925.
- Schaid D.J. // Genetics. 2004. V. 166. P. 505–512.
- de Bakker P.I., Yelensky R., Pe'er I., Gabriel S.B., Daly M.J., Altshuler D. // Nat. Genet. 2005. V. 7. № 11. P. 1217–1223.
- Zhao H., Nettleton D., Soller M., Dekkers J.C. // Genet. Res. 2005. V. 86. P. 77–78.
- Fodinger M., Horl W.H., Sunder-Plassmann G. // J. Nephrol. 2000. V. 13. P. 20–33.
- Спиридонова М.Г., Степанов В.А., Пузырёв В.П. // Клини. медицина. 2001. № 2. С. 10–16.
- Jääskeläinen E., Keski-Nisula L., Toivonen S., Romppanen E.L., Helisalmi S., Punnonen K., Heinonen S. // Hypertens. Pregnancy. 2006. V. 25. P. 73–80.
- Назаренко М.С., Пузырев В.П., Лебедев И.Н. // Генетика. 2006. Т. 42. № 5. С. 711–717.
- Фетисова И.Н., Добролюбов А.С., Липин М.А., Поляков А.В. // Вест. нов. мед. технологий. 2007. Т. 10. № 1. С. 12–17.
- Weisberg I., Tran P., Christensen B., Sibani S., Rozen R. // Mol. Genet. Metab. 1998. V. 64. P. 169–172.
- Callejón G., Mayor-Olea A., Jiménez A.J., Gaitán M.J., Palomares A.R., Martínez F., Ruiz M., Reyes-Engel A. // Hum. Reprod. 2007. V. 22. P. 3249–3254.
- Branco C.C., Pereirinha T., Cabral R. // Thromb. J. 2009. V. 7. P. 4–9.
- Rady P.L., Szucs S., Grady J., Hudnall S.D., Kellner L.H., Nitowsky H., Tyring S.K., Matalon R.K. // Am. J. Med. Genet. 2002. V. 107. P. 162–168.
- Melo S.S., Persuhn D.C., Meirelles M.S., Jordao A.A., Vannucchi H. // Mol. Nutr. Food Res. 2006. V. 50. P. 769–774.
- Mao R., Fan Y., Chen F., Sun D., Bai J., Fu S. // Cell Biochem. Funct. 2008. V. 26. P. 352–358.
- Evans D., Cardon L.R. // Am. J. Hum. Genet. 2005. V. 76. P. 681–687.
- Collins A. // Mol. Biotechnol. 2009. V. 41. P. 83–89.
- Phillips M.S. // Nat. Genet. 2003. V. 33. P. 382–387.

42. Wang N., Akey J.M., Zhang K., Chakraborty R., Jin L. // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. V. 71. P. 1227–1234.
43. Wall J.D., Pritchard J.K. // *Nat. Rev. Genet.* 2003. V. 4. P. 587–597.
44. Templeton A.R., Clark A.G., Weiss K.M., Nickerson D.A., Boerwinkle E., Sing C.F. // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 66. P. 69–83.
45. Barrett W.A., Doshi J.M., Hacker C.R., Kautzer C.R., Lee D.H., Marjoribanks C., McDonough D.P., et al. // *Science.* 2001. V. 294. P. 1719–1723.
46. Rana N.A., Ebenezer N.D., Webster A.R., Linares A.R., Whitehouse D.B., Povey S., Hardcastle A.J. // *Hum. Mol. Genet.* 2004. V. 24. P. 3089–3102.
47. Oota H., Pakendorf B., Weiss G., von Haeseler A., Pookajorn S., Settheetham-Ishida W., Tiwawech D., Ishida T., Stoneking M. // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. P. 536–542.
48. Reich D.E., Cargill M., Bolk S., Ireland J., Sabeti P.C., Richter D.J., Lavery T., Kouyoumjian R., Farhadian S.F., Ward R., Lander E.S. // *Nature.* 2001. V. 411. P. 199–204.
49. De La Vega F.M., Su X., Avi-itzhak H. // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. V. 71. P. 205–213.
50. Liu N., Sawyer S.L., Mukherjee N., Pakstis A.J., Kidd J.R., Kidd K.K., Brookes A.J., Zhao H. // *Genetic Epidemiol.* 2004. V. 27. P. 385–400.
51. Zhang K., Qin Z., Liu J., Chen T., Waterman M.S., Sun F. // *Genome Res.* 2004. V. 14. P. 908–916.
52. Service S., Sabatti C., Freimer N. // *Genetic Epidemiol.* 2007. V. 31. P. 189–194.
53. Gonzalez-Neira A., Ke X., Lao O., Lao O., Calafell F., Navarro A., Comas D., Cann H., Bumpstead S., Ghori J., et al. // *Genome Res.* 2006. V. 16. P. 323–330.
54. Barrett J.C., Cardon L.R. // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. P. 659–662.
55. Hao K. // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. № 23. P. 3178–3184.
56. Carlson C.S., Eberle M.A., Rieder M.J., Smith J.D., Kruglyak L., Nickerson D.A. // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. P. 518–521.
57. Halperin E., Kimmel G., Shamir R. // *Bioinformatics.* 2005. V. 21. P. 195–203.
58. Montpetit A., Nelis M., Laflamme P., Magi R., Ke X., Remm M., Cardon L., Hudson T.J., Metspalu A. // *PLoS Genet.* 2006. V. 2. № 3. e27.
59. Gu S., Pakstis A.J., Li H., Speed W.C., Kidd J.R., Kidd K.K. // *Eur. J. Human Genet.* 2007. V. 15. P. 302–312.
60. Lundmark P.E., Liljedahl U., Boomsma D.I., Mannila H., Martin N.G., Palotie A., Peltonen L., Perola M., Spector T.D., Syvänen A.C. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2008. V. 16. № 9. P. 1142–1150.
61. de Bakker P.I., Burt N.P., Graham R.R., Guiducci C., Yelensky R., Drake J.A., Bersaglieri T., Penney K.L., Butler J., Young S., et al. // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. P. 1298–1303.
62. Hu C., Jia W., Zhang W., Wang C., Zhang R., Wang J., Ma X. // *BMC Genet.* 2008. V. 27. P. 9–19.
63. Степанов В.А. Этногеномика населения Северной Евразии. Томск: Печатная мануфактура, 2002. 244 с.
64. Горлов И.П., Горлова О.Ю. // *Вестник ВОГиС.* 2007. Т. 11. № 2. С. 363–372.
65. Kidd K.K., Kidd J.R. *Human genetic variation of medical significance. Evolution in Health and Disease.* N.Y.: Oxford Univ. Press, 2008. 363 p.
66. Tenesa A., Navarro P., Hayes B.J., Duffy D.L., Clarke G.M., Goddard M.E., Visscher P.M. // *Genome Res.* 2007. V. 17. № 4. P. 520–526.
67. Spiroski I., Kedev S., Antov S., Arsov T., Krstevska M., Dzhekova-Stojkova S., Kostovska S., Trajkov D., Petlichkovski A., Strezova A., et al. // *Croat Med. J.* 2008. V. 49. P. 39–49.
68. Mayor-Olea A., Callejon G., Palomares A.R., Jiménez A.J., Gaitán M.J., Rodríguez A., Ruiz M., Reyes-Engel A. // *BMC Med. Genet.* 2008. V. 9. P. 104.
69. Haggarty P., Campbell D.M., Duthie S., Andrews K., Hoad G., Piyathilake C., Fraser I., McNeill G. // *BJOG.* 2008. V. 115. № 7. P. 851–856.
70. Guéant-Rodriguez R.M., Guéant J.L., Debard R., Thirion S., Hong L.X., Bronowicki J.P., Namour F., Chabi N.W., Sanni A., Anello G., et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* 2006. V. 83. № 3. P. 701–707.
71. Wilcken B., Bamforth F., Li Z., Zhu H., Ritvanen A., Renlund M., Stoll C., Alembik Y., Dott B., Czeizel A.E., et al. // *J. Med. Genet.* 2004. V. 41. № 8. P. 619–625.

УДК 500-599.57.088

Рекомбинантная форма TERT *Hansenula polymorpha* обладает ограниченной обратнотранскриптазной активностью

Е. М. Смекалова*, О. А. Петрова, М. Э. Зверева, О. А. Донцова

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

*E-mail: esmekalova@yahoo.com

Поступила в редакцию 09.12.2011 г.

РЕФЕРАТ Теломераза – рибонуклеопротеидный комплекс, функция которого состоит в синтезе теломер, повторяющихся последовательностей, локализованных на концах эукариотических хромосом. Теломераза поддерживает стабильность генома эукариотических клеток за счет репликации концов хромосом. Структурно-функциональные исследования теломеразного комплекса существенно затрудняет сложность получения основной каталитической субъединицы теломеразы в рекомбинантной форме. В представленном сообщении описан метод выделения теломеразной обратной транскриптазы термотолерантных дрожжей *Hansenula polymorpha*, экспрессированной в клетках *Escherichia coli*. Функциональный тест на субстрате, моделирующем взаимодействие теломеразной РНК и теломеры, показывает, что полученный белок обладает ограниченной обратнотранскриптазной активностью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА теломеразная обратная транскриптаза, рекомбинантные белки, термотолерантные дрожжи *Hansenula polymorpha*.

ВВЕДЕНИЕ

Теломераза представляет собой рибонуклеопротеидный комплекс, функция которого состоит в синтезе теломер – расположенных на концах хромосом повторяющихся последовательностей, неспособных реплицироваться с помощью механизма классической репликации. Теломераза активна в клетках, способных к неограниченному делению, таких, как половые и стволовые клетки, а также в большинстве (85%) типов злокачественных опухолей. Предполагается, что ингибирование каталитической функции теломеразы приведет к прекращению поддержания длины теломер, что отменит безграничный репликативный потенциал опухолевых клеток. Все это позволяет считать теломеразу универсальной мишенью для создаваемых противоопухолевых средств [1]. Основные компоненты теломеразы – белок, теломеразная обратная транскриптаза (TERT) и теломеразная РНК, по матрице которой осуществляется синтез теломерной последовательности [2]. Одна из главных трудностей, с которой сталкиваются при изучении теломеразы, состоит в низкой стабильности ее каталитической субъединицы, выделяемой в рекомбинантной форме [3]. Отсутствие данных о структуре теломеразы не позволяет провести докинг известных веществ с целью поиска потенциальных эффекторов этого фермента, а невозможность выделения полно-

размерной функциональной теломеразной обратной транскриптазы препятствует тестированию взаимодействий фармакологических агентов с мишенью. Единственная полноразмерная теломеразная обратная транскриптаза, которую к настоящему времени удалось выделить и закристаллизовать, это TERT *Tribolium castaneum* [4]. Отличительная особенность этого белка состоит в отсутствии N-концевого домена, характерного для других теломеразных обратных транскриптаз. Получены данные о структуре N-концевого домена теломеразной каталитической субъединицы *Tetrahymena thermophila* и ее РНК-связывающего домена [2, 5].

Использование термофильных организмов часто более перспективно для структурно-функционального изучения белков, так как они имеют более компактную пространственную организацию, что способствует стабилизации в растворе. Ранее мы идентифицировали теломеразную обратную транскриптазу термотолерантных дрожжей *Hansenula polymorpha* (hpTERT) и впервые показали, что hpTERT можно экспрессировать в клетках *Escherichia coli* и выделить рекомбинантный белок [6]. Нами разработан метод эффективного выделения hpTERT *H. polymorpha*, экспрессированного в *E. coli*. Мы использовали экспрессионные конструкции, позволяющие получить каталитическую субъединицу

теломеразы с различными аффинными метками либо на N-, либо на C-конце белка. Показано, что оптимальным для экспрессии и выделения hrTERT является вектор рЕТ30aTEV, в котором открытая рамка считывания кодирует hrTERT с 6His- и S-тагами с N-конца. Мы провели тест, который подтвердил наличие обратнотранскриптазной активности у полученного белка, что доказывает его пригодность для функциональных и структурных исследований. Мы считаем, что данное сообщение будет полезно не только исследователям теломеразы, но и всем, кто сталкивался с проблемой получения рекомбинантных белков, нестабильных в растворимой форме.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование гена hrTERT в различные экспрессионные системы

Ген hrTERT клонировали с использованием следующих праймеров: 1) BamH1a/E2 – 5'-aagatccaaggttgatcagatggtgatga-3', и E2/Pst1/Rev – 5'-tttctgcagttagaatgctttaagaagcga-3' – для получения плазмиды рCDF, где hrTERT слит с 6His-тагом с N-конца; 2) Nco1E2Fwd – 5'-aaaaccatgggaaggttgatcagatggtgat-3', и E2Sal1Rev – 5'-ttttgtcgac gaatgctttaagaagcgaac-3' – для получения рЕТ33b+, где hrTERT слит с 6His-тагом с C-конца; 3) HpET30F – 5'-gacggagctcgaattttattagaatgctttaagaagcgaac-3', и HpET30S – 5'-gtattttcagggcgccatgaggttgatcagatggtgat-3' – для получения плазмиды рЕТ30aTEV, где hrTERT слит с 6His- и S-тагами с N-конца. Плазмида рЕТ30aTEV любезно предоставлена Даниелой Родэс (Кембридж, MRC LMB, Великобритания). Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer.

Выделение и очистка рекомбинантного hrTERT

Клетки *E. coli* штамма BL21DE3, трансформированного плазмидой рCDF_hrTERT, либо рЕТ33b_hrTERT, либо рЕТ30_hrTERT, растили при 37°C до оптической плотности 0.1–0.3 (OD_{600}), после чего индуцировали экспрессию белка 0.1 мМ изопропилтио-β-D-галактозидом (IPTG) и инкубировали при перемешивании в течение 12–16 ч при 16°C. Клетки собирали центрифугированием при 5000 об/мин и замораживали в жидком азоте, разрушали с помощью дисмембратора (2000 об/мин, 2 раза по 30 с), что способствовало меньшей денатурации белка в процессе выделения. Разрушенные клетки ресуспендировали в буфере А: 50 мМ NaH₂PO₄ (рН 7), 200 мМ NaCl, 10% глицерин, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0.05% Твин-20. Клеточный де-

брис отделяли с помощью центрифугирования при 15000 об/мин в течение 20 мин. Затем инкубировали клеточный лизат с Ni-NTA-агарозой в течение 30 мин при 4°C, аффинный сорбент отделяли от несвязавшейся фракции белков центрифугированием при 3000 об/мин с последующим декантированием супернатанта. Ni-NTA-агарозу промывали трижды буфером А, содержащим 50 мМ имидазол. Белок hrTERT, связавшийся с аффинным сорбентом, элюировали буфером А с 300 мМ имидазолом.

При проведении дополнительной очистки с помощью ионообменной хроматографии на SP-сефарозе препарат, полученный на предыдущем этапе, разбавляли до суммарной концентрации солей 150 мМ, добавляли предварительно уравновешенную в буфере Б (50 мМ NaH₂PO₄ (рН 7), 100 мМ NaCl, 10% глицерин, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0.05% Твин-20) SP-сефарозу (~1 мл на 5 мл лизата) и инкубировали смесь в течение 30 мин при 4°C. Затем промывали буфером, содержащим 50 мМ NaH₂PO₄, 200 мМ NaCl, 10% глицерин, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0.05% Твин-20. Связавшуюся фракцию белков смывали градиентом концентрации NaCl (0.1–1 М) в аналогичном буфере. В полученный образец добавляли глицерин (до 30%), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Проверка функциональности очищенного hrTERT в системе *in vitro*

Тест на функциональность hrTERT проводили в системе, содержащей 50 мМ Трис-HCl, 1 мМ DTT (дителиотреитол), 1 мМ спермидин, 50 мкМ dCTP, 5 мкМ субстрат (использовали РНК-олигонуклеотид 5'-cgcccccacc-3', ДНК-олигонуклеотиды 5'-cgccacc-3', 5'-ggcggcggggtg-3'), 3.75 мкМ [α -³²P]-dGTP (800 Ки/ммоль), 5 мкМ hrTERT. Дуплексы (ДНК-ДНК либо ДНК-РНК) формировали предварительно отжигом соответствующих олигонуклеотидов. Реакция продолжалась в течение 30 мин при 37°C, после чего смесь обрабатывали протеиназой К (0.3 мг/мл) и переосаждали в спирте. Продукты реакции разделяли с помощью гель-электрофореза в 15% денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ). Радиоактивный сигнал детектировали с помощью системы Phosphorimager.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ген белка hrTERT клонировали под T7-промотор в три различные системы экспрессии с целью последующего выделения белка из клеток *E. coli*: 1) рCDF с 6His-тагом на N-конце белка hrTERT, 2) рЕТ33b+ с 6His-тагом на C-конце белка hrTERT, 3) рЕТ30aTEV с 6His- и S-тагами на N-конце белка hrTERT. Подобное расположение тагов с разных сто-

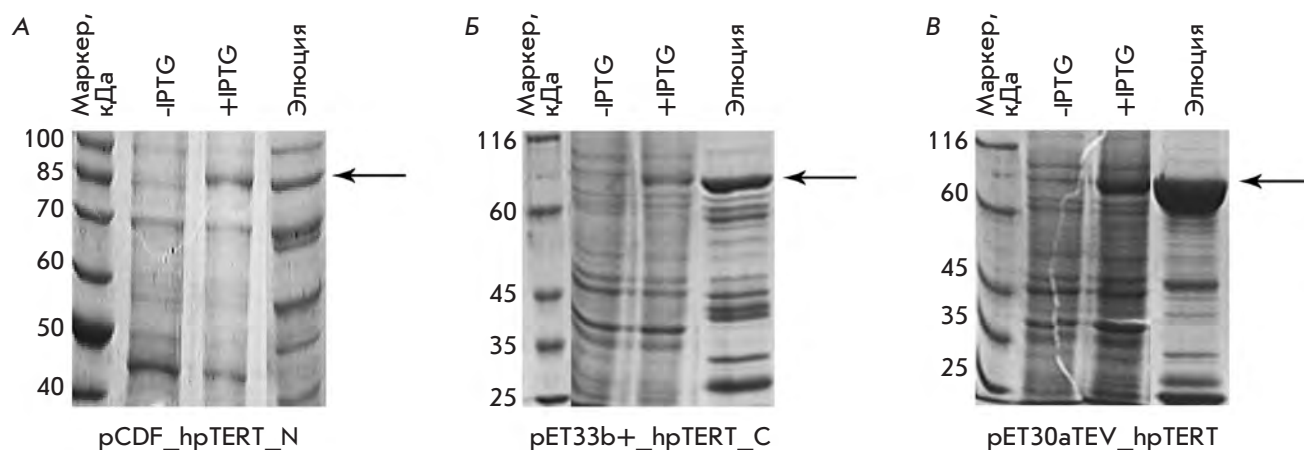


Рис. 1. Результаты экспрессии и аффинного выделения рекомбинантной теломеразной обратной транскриптазы *H. polymorpha* из клеток *E. coli*, трансформированных различными генно-инженерными конструкциями. А – *hprtTERT* в векторе pCDF с 6His-тагом на N-конце белка; Б – *hprtTERT* в векторе pET33b+ с 6His-тагом на С-конце белка; В – *hprtTERT* в векторе pET30aTEV с 6His- и S-тагами на N-конце белка. Образцы клеток до и после индукции экспрессии IPTG, а также образец элюции *hprtTERT* с Ni-NTA-агарозы проанализировали методом электрофореза в 10% ПААГ в денатурирующих условиях. Положение зоны, соответствующей *hprtTERT*, отмечено стрелкой.

рон белка обусловлено возможностью сворачивания концов аминокислотной цепи внутрь белковой глобулы, с чем может быть связано снижение эффективности аффинной хроматографии. S-таг представляет собой небольшую последовательность (4 кДа), которая может использоваться для стабилизации белков в растворе. Экспрессию белков индуцировали IPTG, белки очищали с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Результаты выделения белков, экспрессированных с использованием различных конструкций, представлены на рис. 1. *hprtTERT* детектируется во всех образцах, элюированных с Ni-NTA-агарозы. Это говорит об успехе выбора термотолерантных дрожжей в качестве источника каталитической субъединицы теломеразы. Однако при использовании векторов pCDF и pET33b+ и при расположении тага как с N-, так и с С-конца (рис. 1А,Б), вместе с целевым белком на смоле выделяется значительное количество примесей. Нужно отметить, что соотношение целевой белок-примеси лучше при использовании конструкции pET33b+ с 6His-тагом на С-конце белка, что, скорее всего, отражает закрытую ориентацию N-концевой области *hprtTERT*. Выделение белка с использованием S-тага (конструкция pET30aTEV) дает принципиально лучший результат (рис. 1В). Очевидно, что хорошо структурированный небольшой N-концевой S-таг значительно повышает стабильность растворимой формы белка. Белок был выделен и дополнительно очищен с помощью ионообменной хроматографии на SP-сефарозе (рис. 2). Конечные характеристики полученного белкового препарата – концентрация 5

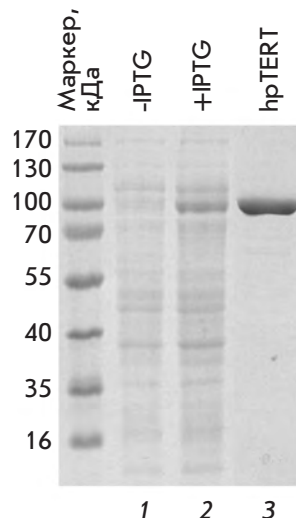


Рис. 2. Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантной *hprtTERT*, полученной из клеток *E. coli*, трансформированных вектором pET30aTEV_ *hprtTERT*. Дорожки 1 и 2 – белки суммарных клеточных лизатов *E. coli* до и после индукции IPTG. Образец в дорожке «*hprtTERT*» соответствует белковому препарату, полученному с помощью дополнительной очистки посредством аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе и ионообменной хроматографии на SP-сефарозе. Анализ проводили методом электрофореза в 10% ПААГ в денатурирующих условиях.

мг/мл, выход – 5 мг/л клеточной культуры *E. coli*, содержание примесей не более 1%.

Функциональность полученного белка мы подтвердили с помощью сконструированной нами *in vitro*-системы. Теломеры *H. polymorpha* состоят из 18–23 повторов (5'-GGGTGGCG-3') [7]. На основании этих данных можно предположить состав матричного участка теломеразной РНК и смоделировать ДНК-олигонуклеотид, представляющий теломеру. Таким образом, система содержала очищенную рекомбинантную каталитическую субъединицу теломеразы; субстрат, представляющий собой гибридный

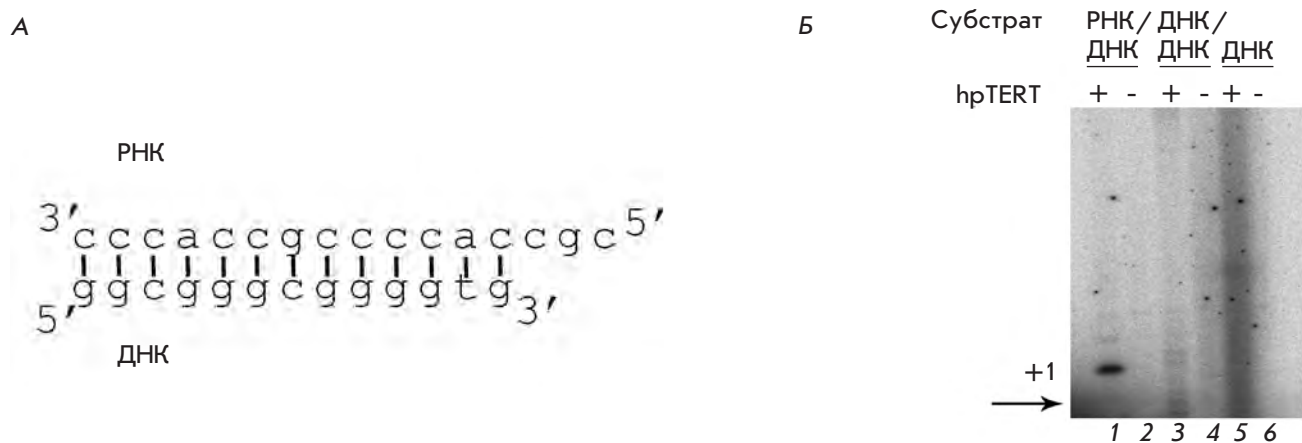


Рис. 3. Проверка функциональной активности hrTERT, выделенной из клеток *E. coli*, трансформированных вектором pET30aTEV_hrTERT. А – Схема РНК-ДНК-дуплекса, используемого в качестве субстрата для hrTERT в реакции обратной транскрипции; Б – продукты реакции с участием hrTERT (добавление белка в реакционную смесь обозначено «+», те же компоненты без добавления белка обозначены «-» над рисунком) и различных субстратов (тип субстрата указан над рисунком) проанализированы методом электрофореза в 15% ПААГ в денатурирующих условиях. Для визуализации продуктов удлинения ДНК-олигонуклеотида в реакционной смеси присутствует $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$. Зона, соответствующая по подвижности исходному ДНК-олигонуклеотиду, отмечена стрелкой. Отсутствие явных продуктов удлинения ДНК-олигонуклеотида во всех дорожках, кроме первой, свидетельствует о получении активной hrTERT в растворимой форме.

РНК-ДНК-дуплекс со свободным 3'-концом (рис. 3А); смесь нуклеотидов, в которой для визуализации удлинения олигонуклеотида использовали $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$. В качестве контроля использовали аналогичный ДНК-ДНК-дуплекс либо одноцепочечную теломеразную ДНК. Поскольку каталитическая субъединица теломеразы является обратной транскриптазой, такие субстраты не могут использоваться hrTERT для удлинения. Кроме того, каждую реакцию проводили в присутствии и в отсутствие hrTERT (рис. 3Б). На дорожке 1 (рис. 3Б) можно наблюдать специфичный сигнал, соответствующий присоединению dGTP к ДНК-олигонуклеотиду в РНК-ДНК-дуплексе. Эта зона отсутствует в системах с другими субстратами и в отсутствие белка, что исключает участие полимераз *E. coli* в данной реакции. ДНК-РНК-дуплекс, используемый в реакции, спланирован таким образом, что теоретически в этой системе возможно присоединение трех нуклеотидов. Сигналы, соответствующие присоединению второго и третьего нуклеотидов, можно также видеть на дорожке 1 рис. 3Б, однако их интенсивность намного ниже. Скорее всего, это связано с отсутствием в системе полноразмерной теломеразной РНК, необходимой для реконструкции теломеразной активности *in vitro*. Тем не менее присоединение даже одного нуклеотида говорит о наличии у белка специфичной обратнотранскриптазной активности и о сохранении им функциональной структуры.

Таким образом, конструкция pET30aTEV с hrTERT, где 6His- и S-аффинные таги расположены

с N-конца белка, может быть использована для получения рекомбинантной функциональной каталитической субъединицы теломеразы *H. polymorpha*. Это открывает новые возможности для определения структуры теломеразной обратной транскриптазы и изучения механизма ее работы. ●

Мы благодарим Даниелу Родэс (MRC LMB, Кембридж, Великобритания) за предоставленную плазмиду pET30aTEV.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (Р1390 № 02.740.11.07.06, 16.512.11.2108) и Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 11-04-01310-а и 11-04-12051-ofi-m-2011, ПНР 5.13).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zvereva M.I., Shcherbakova D.M., Dontsova O.A. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2010. V. 75. № 75. P. 1563–1583.
- Wyatt H.D., West S.C., Beattie T.L. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 17. № 38. P. 5609–5622.
- Jacobs S.A., Podell E.R., Wuttke D.S., Cech T.R. // *Protein Sci.* 2005. V. 8. № 14. P. 2051–2058.
- Gillis A.J., Schuller A.P., Skordalakes E. // *Nature*. 2008. V. 7213. № 455. P. 633–637.
- Jacobs S.A., Podell E.R., Cech T.R. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006. V. 3. № 13. P. 218–225.
- Smekalova E.M., Petrova O.A., Zvereva M.I., Dontsova O.A. // *CSHL meeting «Telomeres&telomerase»*. 2009. P. 161.
- Sohn J.H., Choi E.S., Kang H.A., Rhee J.S., Rhee S.K. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 3. № 181. P. 1005–1013.

УДК 577.112.6

Конформационные отличия активных ангиотензинов от их неактивных предшественников

О. Н. Солопова^{1*}, Л. П. Позднякова¹, Н. Е. Варламов¹, М. Н. Боков¹, Е. В. Морозкина²,
Т. А. Ягудин², П. Г. Свешников¹

¹ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения», 117149, Москва, Симферопольский бул., 8

²Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

*E-mail: solopova@msn.com

Поступила в редакцию 28.10.2011 г.

РЕФЕРАТ Вопрос о влиянии аминокислотного окружения определенных участков белка на их конформацию остается малоизученным. На примере ангиотензинов 1, 2 и 3 – метаболитов ангиотензиногена, мы показали, что одни и те же аминокислотные последовательности в составе разных молекул могут иметь существенные конформационные различия. С этой целью получены высокоаффинные моноклональные антитела против ангиотензинов 1, 2 и 3 и изучена их кросс-реактивность между разными ангиотензинами и ангиотензиногеном. Сделан вывод о том, что конформации неактивных молекул – ангиотензина 1 и соответствующего участка ангиотензиногена – сходны между собой, конформации активных ангиотензинов 2 и 3 также сходны между собой, тогда как конформации гомологичных участков у активных и неактивных ангиотензинов существенно отличаются.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА пептиды, конформация, ангиотензины, ангиотензиноген, моноклональные антитела.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Анг1 – ангиотензин 1 человека; Анг2 – ангиотензин 2 человека; Анг3 – ангиотензин 3 человека; ИФА – иммуноферментный анализ; ПААГ – полиакриламидный гель; Hsp70 – белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа; K_d – константа диссоциации.

ВВЕДЕНИЕ

Со времени возникновения в 1975 г. гибридной технологии [1] получено множество моноклональных антител к самым разным субстанциям. Тем не менее потребность в новых антителах не уменьшается: требуются антитела, обладающие заданными свойствами, антитела к определенным эпитопам, а также к вновь открываемым белкам и другим органическим и неорганическим соединениям. Как правило, новые белки удается получить в очень ограниченных количествах, а зачастую их чрезвычайно сложно или даже невозможно выделить в чистом виде, сохранив при этом природную конформацию. Такие белки не могут использоваться для иммунизации при получении антител, поэтому часто единственным выходом оказывается иммунизация синтетическими пептидами, соответствующими определенным участкам желаемого белка. При очевидных преимуществах этот подход не лишен недостатков: в составе белка пептиды имеют значительно меньше степеней свободы, чем в свободном состоянии. В результате антитела против пептидов не всегда способны связывать полноразмерный белок [2].

Классическим примером структурных различий пептидов в составе их белкового предшественника и пептидов в свободном состоянии служит ангиотензиноген человека и его метаболиты – ангиотензины 1, 2 и 3. Ангиотензин 1 (Анг1) – прогормон, который состоит из 10 аминокислотных остатков и образуется из ангиотензиногена в результате отщепления N-концевого пептида [3]. Анг1 не обладает физиологической активностью и служит субстратом для образования активных ангиотензинов 2 и 3. Ангиотензин 2 (Анг2) отличается от ангиотензина 1 отсутствием двух C-концевых аминокислотных остатков, а ангиотензин 3 (Анг3) короче ангиотензина 2 на один N-концевой остаток (рисунки). Анг1 содержит те же аминокислоты, что и Анг2, однако он не способен связываться с рецепторами Анг2 и запускать тем самым эффекторные функции [4]. Наиболее вероятное объяснение этому – конформационные различия ангиотензинов 1 и 2. Для подтверждения этой гипотезы мы получили моноклональные антитела против ангиотензинов 1, 2 и 3 и исследовали их кросс-реактивность в отношении разных ангиотензинов и ангиотензиногена.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ангиотензиноген	Asp	- Arg	- Val	- Tyr	- Ile	- His	- Pro	- Phe	- His	- Leu	- Leu	- Val	- Tyr	- Ser
Ангиотензин 1	Asp	- Arg	- Val	- Tyr	- Ile	- His	- Pro	- Phe	- His	- Leu				
Ангиотензин 2	Asp	- Arg	- Val	- Tyr	- Ile	- His	- Pro	- Phe						
Ангиотензин 3		Arg	- Val	- Tyr	- Ile	- His	- Pro	- Phe						

Аминокислотные последовательности предшественников ангиотензина 2 и его метаболитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы человеческий рекомбинантный ангиотензиноген («Sigma», США), ангиотензины 1, 2 и 3 («American peptide», США), рекомбинантный Hsp70 из *Mycobacterium tuberculosis*, полученный в нашей лаборатории [5], мыши линии BALB/c, линия клеток мышечной миеломы sp2/0.

Получение моноклональных антител против ангиотензинов 1, 2 и 3

Мышей иммунизировали в подушечки задних лап препаратами ангиотензинов, конъюгированных с адъювантным белком Hsp70 из *M. tuberculosis*, как описано ранее [6], дважды с интервалом 2 нед в дозировке 100 мкг конъюгата на одну иммунизацию. Первую иммунизацию проводили используя полный адъювант Фрейнда, вторую – неполный адъювант Фрейнда. На 3-й день после второй иммунизации клеток подколенных лимфоузлов гибридовали с клетками миеломы sp2/0 по стандартной методике [1]. Супернатанты гибридом тестировали с использованием непрямого [7] и конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) [8], позитивные клоны клонировали 2–4 раза, антитела нарабатывали в асцитных жидкостях мышей и выделяли при помощи аффинной хроматографии на белок-G-сефарозе [9]. Чистоту антител контролировали с помощью электрофореза в 12% ПААГ согласно [10].

Характеристика антител

Специфичность полученных антител определяли при помощи прямого и конкурентного ИФА [7, 8]. Аффинность антител против каждой из мишеней оценивали, измеряя константы диссоциации (K_d), как описано в работе Клотца [11] с модификациями Фриге [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ангиотензин 1 человека и мыши, как и ангиотензины 2 и 3, имеют идентичную аминокислотную последовательность [13]. Кроме того, ангиотензины 2 и 3 обладают физиологической активностью и введение их

в организм в дозах, необходимых для иммунизации (10–50 мкг/мышь), приводит к быстрому летальному исходу даже при внутримышечном и подкожном введении. Все это делает ангиотензины крайне неудобными иммуногенами, однако конъюгирование с адъювантным белком Hsp70 из *M. tuberculosis* позволило преодолеть иммунологическую толерантность и устранить токсичность. В результате были получены моноклональные антитела против каждого из ангиотензинов.

Специфичности полученных антител определяли иммуноферментным анализом (табл. 1). Непрямой ИФА выявил взаимодействие антител с сорбированными мишенями. В такой системе часть структурных единиц ангиотензиногена и пептидов оказывается недоступной для антител, а часть – искажена. Методом конкурентного ИФА установлено взаимодействие антител с белком и пептидами в однофазной системе – в растворе, а определение констант диссоциации позволило количественно оценить силу взаимодействия (табл. 2).

Наиболее аффинное антитело, полученное против ангиотензина 1 – AngC11 ($K_d = 1.3 \times 10^{-10}$), практически не связывает сорбированный Ang1, а также не взаимодействует с ангиотензинами 2 и 3 ни в прямом, ни в конкурентном ИФА. В то же время AngC11 узнает ангиотензиноген как сорбированный, так и в растворе. Все это свидетельствует о том, что либо эпитоп этого антитела содержит аминокислотные остатки, которые отщепляются при образовании ангиотензинов 2 и 3, либо структура этого участка у Ang1 и Ang2 и 3 настолько различается, что антитело способно связывать только Ang1.

Антитела, полученные в результате иммунизации ангиотензинами 2 и 3, напротив, узнают только ангиотензины 2 и 3, не делая различий между ними в конкурентном анализе и предпочитая Ang2 в прямом ИФА независимо от того, каким из ангиотензинов (вторым или третьим) проводили иммунизацию. Лучшее узнавание ангиотензина 2 в прямом ИФА легко объяснить лучшей способностью к сорбции Ang2 по сравнению с более коротким и менее ги-

Таблица 1. Взаимодействие антител с ангиотензинами 1, 2 и 3 и ангиотензиногеном в непрямом и конкурентном ИФА

Иммуноген	Антитело	Непрямой ИФА				Конкурентный ИФА			
		А-ген	Анг1	Анг2	Анг3	А-ген	Анг1	Анг2	Анг3
Анг1	AngE9	-	+	-	-	-	+	-	-
	AngC9	+	+	-	-	+	+	±	±
	AngC11	+	±	-	-	+	+	-	-
Анг2	AngIIE7	-	-	+	±	-	-	+	+
Анг3	AngIIIB7	-	-	+	±	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
	AngIIIF7	-	-	+	±	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

Примечание: А-ген – ангиотензиноген, н.о. – не определяли.

дропильным Анг3. Ни одно из антител против Анг2 и Анг3 не узнает ангиотензин 1 и ангиотензиноген ни в одном варианте иммуноферментного анализа, несмотря на то, что и Анг1, и ангиотензиноген содержат аминокислотные последовательности, входящие в состав ангиотензинов 2 и 3.

ВЫВОДЫ

Суммируя полученные результаты, можно сделать следующие выводы:

1. ангиотензин 1 в свободном виде и в составе ангиотензиногена имеет одинаковую конформацию;
2. отщепление от Анг1 двух аминокислотных остатков существенно меняет конформационную структуру всего пептида, образовавшийся ангиотензин 2 конформационно отличается от участков с идентичными аминокислотными последовательностями в составе ангиотензина 1 и ангиотензиногена;
3. отщепление одного аминокислотного остатка от ангиотензина 2 не изменяет существенно конформационную структуру пептида; конформация образовавшегося в результате ангиотензина 3 сходна с конформацией ангиотензина 2 и совершенно отличается от конформации соответствующих участков Анг1 и ангиотензиногена;
4. используя короткие пептиды для получения моноклональных антител против белков, нужно учитывать возможность полного преобразования антигенных детерминант белка, синтезированных в виде пептидов; пептиды, сорбированные на твердой фазе, также могут иметь существенные конформационные отличия от растворимых пептидов с той же аминокислотной последовательностью.

Таблица 2. Константы диссоциации (K_d) для антител против ангиотензинов 1 и 2 с разными мишенями

Антитело	K_d , М			
	А-ген	Анг1	Анг2	Анг3
AngE9	$>10^{-5}$	4.7×10^{-7}	$>10^{-5}$	$>10^{-5}$
AngC9	4.0×10^{-8}	7.7×10^{-9}	3.0×10^{-5}	3.0×10^{-5}
AngC11	1.25×10^{-8}	1.3×10^{-10}	5.5×10^{-6}	2.3×10^{-5}
AngIIE7	$>10^{-5}$	$>10^{-5}$	6.0×10^{-7}	2.0×10^{-6}

Превращение неактивных ангиотензина 1 и ангиотензиногена в их активные Анг2 и Анг3 сопровождается существенной конформационной перестройкой соответствующих участков пептидной или белковой молекулы. ●

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Превращение неактивных ангиотензина 1 и ангиотензиногена в их активные Анг2 и Анг3 сопровождается существенной конформационной перестройкой соответствующих участков пептидной или белковой молекулы. ●

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 16.512.12.2012 «Создание штаммов-продуцентов рекомбинантных гуманизированных Fab-фрагментов к фактору некроза опухоли альфа и предшественникам активных ангиотензинов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kohler G., Milstein C. // *Nature*. 1975. V. 256. P. 495–497.
2. Свешников П.Г., Малайцев В.В., Богданова И.М., Солопова О.Н. Введение в молекулярную иммунологию и гибридную технологию. М.: МГУ, 2006.
3. de Gasparo M., Catt K.J., Inagami T., Wright J.W., Unger T. // *Pharmacol. Rev.* 2000. V. 52. P. 415–472.
4. Boucher R., Demassieux S., Garcia R., Genest J. // *Circ. Res.* 1977. V. 41. P. 26–29.
5. WO2005/028510. Methods, Kits and Compositions for the Developments and Use of Monoclonal Antibodies Specific to Antigens of Low Immunogenicity. Patent USA. 2005.
6. Свешников П.Г., Городецкая С.Б., Шемчукова О.Б., Солопова О.Н., Боков М.Н., Варламов Н.Е., Ульянов А.М., Лютова Е.М., Киселев В.И., Бударина С.О., Ашрафян Л.А. // *Молекул. медицина*. 2009. V. 4. P. 45–50.
7. Engvall E., Perlmann P. // *Immunochemistry*. 1971. V. 8. № 9. P. 871–874.
8. Engvall E., Jonsson K., Perlmann P. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1971. V. 251. № 3. P. 427–434.
9. Jungbauer A., Tauer C., Reiter M., Purtscher M., Wensch E., Steindl F., Buchacher A., Katinger H. // *J. Chromatogr.* 1989. V. 476. P. 257–268.
10. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
11. Klotz I.M. *The Proteins* / Eds Neurath H., Bailey K. N.Y.: Acad. Press, 1953. V. 1. P. 727.
12. Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E. // *J. Immunol. Methods*. 1985. V. 77. P. 305–319.
13. Clouston W.M., Evans B.A., Haralambidis J., Richards R.I. // *Genomics*. 1988. V. 2. P. 240–248.

УДК 576.314:577.352.5

Мониторинг дзета-потенциала клеток человека при снижении их жизнеспособности и взаимодействии с полимерами

О. В. Бондарь*, Д. В. Сайфуллина, И. И. Мавлютова, Т. И. Абдуллин

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

*E-mail: oxanav.bondar@gmail.com

Поступила в редакцию 08.01.2012 г.

РЕФЕРАТ Изучены аналитические возможности метода динамического рассеяния света (ДРС) для оценки состояния цитоплазматической мембраны клеток человека. Методом ДРС с использованием анализатора Malvern Zetasizer предложено измерять дзета-потенциал клеточных линий и клеток крови в суспензии. При pH 7.4 дзета-потенциал варьирует от -19.4 ± 0.8 мВ у клеток HeLa до -31.8 ± 1.1 мВ у эритроцитов, что, по-видимому, обусловлено различиями в биохимическом составе мембран этих клеток. Тепловая обработка клеток HeLa приводила к смещению их дзета-потенциала в область отрицательных значений на 4.2 мВ. Изменение дзета-потенциала коррелировало с увеличением содержания фосфатидилсерина, одного из ранних маркеров апоптоза, на поверхности клеток. Метод ДРС применили для изучения особенностей взаимодействия с клетками мембранотропных полимеров – поликатионов и неионогенного плуроника.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА динамическое рассеяние света, дзета-потенциал, клетки линий HeLa, MCF-7, эритроциты, моноклеарные клетки, апоптоз, фосфатидилсерин, мембранотропные полимеры.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДРС – динамическое рассеяние света; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Определение морфологических и биохимических особенностей клеток человека необходимо для объективной оценки функционирования различных органов и систем организма [1], создания лекарственных средств [2] и проведения фундаментальных исследований.

Параметры живых клеток в норме и при патологии изучают с использованием прямых спектроскопических методов, таких, как рамановская, диэлектрическая, ЯМР-спектроскопия [3]. Важнейший биофизический параметр клеток – их поверхностный заряд, который зависит от состава цитоплазматической мембраны и физиологического состояния клеток. Поверхностный заряд клеток оценивают, измеряя их электрокинетический потенциал (дзета-потенциал), характеризующий величину потенциала двойного электрического слоя на поверхности клеток. Для регистрации дзета-потенциала животных клеток традиционно используют микроэлектрофорез и капиллярный электрофорез [4], однако это трудоемкие и относительно слабо воспроизводимые методы. Перспективную альтернативу этим методам представляет основанный на динамическом рассеянии света (ДРС) метод электрофоретического рассеяния

света, в котором сдвиг частоты или фазы колебаний луча лазера зависит от подвижности частиц/клеток в переменном электрическом поле [5].

Ранее методом ДРС изучали в основном клетки микроорганизмов [5]. Для анализа дзета-потенциала животных клеток мы применили анализатор Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments»).

Цель представленной работы состояла в оценке аналитических возможностей метода ДРС для определения дзета-потенциала клеток человека в норме, при индукции апоптоза и в условиях обработки мембранотропными полимерами. Мы сравнили дзета-потенциал клеток крови человека (моноклеарных клеток и эритроцитов) и клеточных линий (HeLa, MCF-7), оценили влияние индукции апоптоза под воздействием тепловой обработки, а также адсорбции поликатионов и амфифильного неионогенно-го плуроника L121 на дзета-потенциал клеток HeLa.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты для работы с культурами клеток производства НПП «ПанЭко» (Россия). Клетки аденокарциномы шейки матки HeLa и клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной сыво-

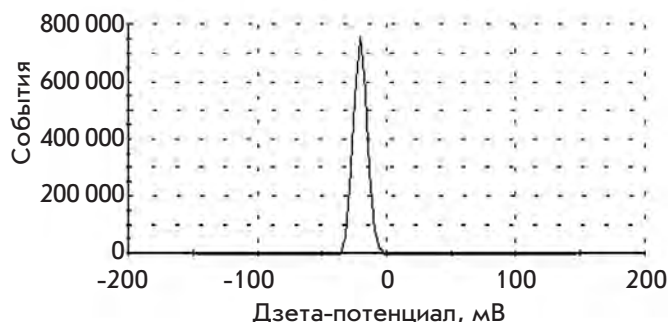


Рис. 1. Кривая распределения дзета-потенциала клеток HeLa (0.5×10^6 клеток/мл), измеренного методом динамического рассеяния света на анализаторе Malvern Zetasizer.

ротки крупного рогатого скота, 2 мМ L-глутамин, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина. Клетки выращивали в полистироловых флаконах и после достижения монослоя переводили в суспензию при помощи 0.05% раствора трипсина в 0.53 мМ EDTA. Концентрацию клеток в суспензии в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (1.7 мМ KH_2PO_4 , 5.2 мМ Na_2HPO_4 , 150 мМ NaCl) определяли на гемцитометре. Гибель клеток индуцировали, подвергая их тепловому шоку (суспензию клеток прогревали при 45°C в течение 30 мин).

Эритроциты и мононуклеарные клетки выделяли из периферической крови условно здоровых доноров, в качестве антикоагулянта использовали 0.27% EDTA. Кровь отстаивали в пробирке в течение 60 мин для осаждения эритроцитов. Содержащую лейкоциты плазму разделяли в градиенте плотности (1.077 г/мл) фиколл-пака при 400g в течение 40 мин. Содержащий мононуклеарные клетки слой отбирали, промывали центрифугированием и суспендировали в ФСБ.

Дзета-потенциал интактных клеток и клеток, подвергнутых тепловой обработке или обработанных полимерами, регистрировали в суспензии (0.5×10^6 клеток/мл) методом электрофоретического светорассеяния на анализаторе Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments», Великобритания). Измерения проводили в U-образной кювете с позолоченными электродами при pH 7.4 и температуре 25°C в фосфатном буфере, не содержащем ионы хлора. Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Dispersion Technology Software 6.2 («Malvern Instruments»).

С целью изучения взаимодействия полимеров с клетками в суспензию клеток (0.5×10^6 клеток/мл) добавляли полиэтиленимин (60 кДа), поли(L-лизин

(~20 кДа) или блок-сополимер этиленоксида и пропиленоксида – плуроник марки L121 («Sigma-Aldrich», США) в различных концентрациях (10, 20, 40, 50, 80 мкг/мл). Смесь инкубировали в течение 10 мин и определяли дзета-потенциал клеток.

Для проведения проточной цитометрии клетки обрабатывали смесью FITC-аннексина V и йодида пропидия в связывающем буфере в соответствии с протоколом производителя («BD Biosciences», США). Анализ проводили на цитометре BD FACSCalibur («BD Biosciences»); количество событий составляло > 20000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовали суспензии клеток крови человека и клеточных линий HeLa и MCF-7. На примере клеток HeLa выяснено, что при pH 7.4 кривая распределения дзета-потенциала имеет максимум при -19.4 мВ (рис. 1). Регистрируемый дзета-потенциал служит мерой потенциала двойного электрического слоя на поверхности клетки [5], и его величина при постоянном составе растворителя должна зависеть от биохимического состава цитоплазмы.

Другие виды исследуемых клеток (MCF-7, мононуклеарные клетки) имели сходные с клетками HeLa значения дзета-потенциала, в то время как у эритроцитов величина дзета-потенциала составляла -31.8 мВ (таблица), что можно объяснить присутствием остатков сиаловой кислоты на поверхности эритроцитов [6]. Отрицательные величины дзета-потенциала мембран клеток при физиологических значениях pH очевидно обусловлены присутствием ионогенных групп в составе фосфолипидов, белков

Значения дзета-потенциала (ζ) некоторых клеток человека и фосфатидилхолиновых липосом при pH 7.4

Клетки	ζ , мВ *
HeLa	-19.4 ± 0.8
MCF-7	-20.9 ± 0.4
Мононуклеарные клетки	-21.9 ± 0.2
Эритроциты	-31.8 ± 1.1
Липосомы (фосфатидилхолин)	-62.3 ± 1.5

*Дзета-потенциал клеток определяли в трех независимых экспериментах. Приведены средние значения ± стандартное отклонение.

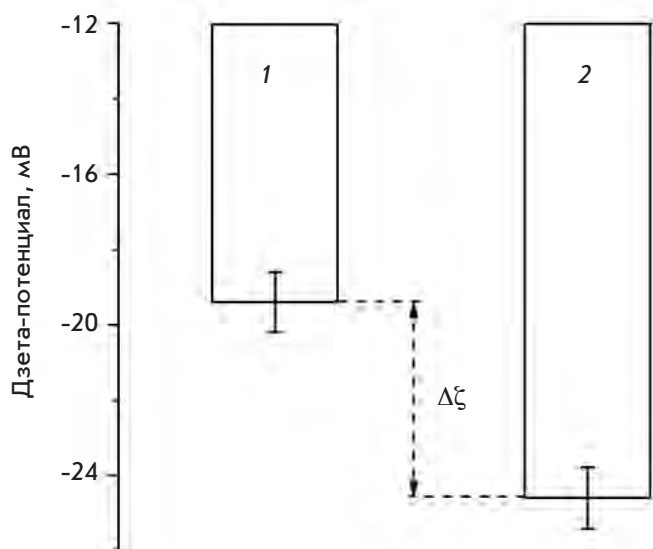


Рис. 2. Величина дзета-потенциала клеток HeLa до и после тепловой обработки (45°C, 30 мин). 1 – Интактные клетки; 2 – клетки, подвергнутые тепловой обработке, $\Delta\zeta$ – величина сдвига дзета-потенциала клеток под воздействием теплового шока.

и их конъюгатов с полисахаридами. Для сравнения в *таблице* приведено значение дзета-потенциала липосом из фосфатидилхолина (преобладающего липида мембран животных клеток), в аналогичных условиях равное почти -62 мВ. Это указывает на значительный вклад липидов в суммарный отрицательный заряд клеточной мембраны.

Далее мы проанализировали изменение дзета-потенциала клеток HeLa, подвергнутых тепловому шоку. Жизнеспособность клеток оценивали на проточном цитометре с использованием смеси красителей FITC-аннексина V, обладающего аффинностью к фосфатидилсерину, и йодида пропидия (PI), окрашивающего некротические клетки. По данным проточной цитометрии, инкубация клеток при 45°C в течение 30 мин приводила к появлению 68% FITC-позитивных клеток и 62% PI-позитивных клеток, что свидетельствует об индукции апоптоза и некроза клеток.

По данным метода ДРС, после подобной обработки среднее значение дзета-потенциала прогретых клеток сдвигалось в область отрицательных значений почти на 4.2 мВ по сравнению с интактными (рис. 2). По-видимому, это связано с перераспределением фосфатидилсерина, несущего отрицательно заряженную карбоксильную группу, из внутреннего липидного слоя плазмалеммы во внешний. Появление фосфатидилсерина в наружном липидном монослое клеточной мембраны является одним из ранних

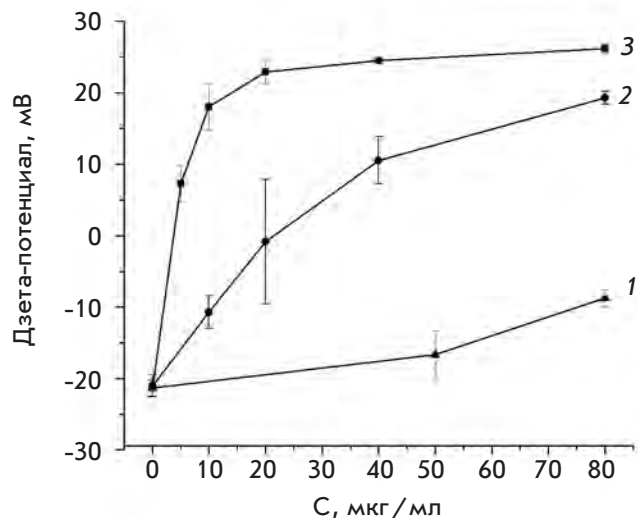


Рис. 3. Изменение величины дзета-потенциала клеток HeLa, обработанных мембранотропными полимерами. 1 – Плуроник L121; 2 – поли(L-лизин); 3 – полиэтиленимин.

маркеров апоптоза и снижения жизнеспособности клеток [6].

Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения метода ДРС для определения изменений биохимического состава мембран клеток человека и, в частности, для выявления фосфатидилсерина во внешнем липидном слое клеток при индукции апоптоза. Предложенный подход не требует использования дорогостоящих красителей и отличается простотой в исполнении.

Представляло интерес методом ДРС оценить как влияют на дзета-потенциал клеток мембранотропные полимеры, используемые в клеточных технологиях и для доставки лекарственных средств. Нами изучено взаимодействие с клетками HeLa модельных поликатионов – полиэтиленимина и поли(L-лизина), широко используемых для конденсации и доставки ДНК в клетки, а также для получения биоадгезивных покрытий для культивирования клеток [7]. Другой полимер – плуроник L121 – представляет собой неионогенный амфифильный блок-сополимер этиленоксида и пропиленоксида. Подобные блок-сополимеры способны обратимо взаимодействовать с клеточными мембранами и изменять активность мембранных транспортеров, что используется для повышения эффективности доставки лекарств в клетки [8].

Добавление к клеткам полилизина в концентрации 20 мкг/мл вызывает нейтрализацию отрицательного

дзета-потенциала клеток, очевидно, вследствие электростатической адсорбции поликатиона на поверхности отрицательно заряженной мембраны (рис. 3). При более высоких концентрациях полилизина (больше 20 мкг/мл) дзета-потенциал клеток изменяется на положительный и достигает максимальных значений в присутствии 80 мкг/мл полилизина. По сравнению с полилизинем полиэтиленимин «перезаряжает» клетки при значительно более низкой концентрации (около 5 мкг/мл), а в насыщающей концентрации сдвигает дзета-потенциал клеток до 26 мВ (рис. 3). Более выраженный эффект полиэтиленимина на величину дзета-потенциала клеток объясняется тем, что этот поликатион обладает большей плотностью положительного заряда, чем полилизин.

Дополнительно оценено влияние плуроника L121 на поверхностный заряд клеток. Плуроник L121 имеет низкое соотношение гидрофильной и липофильной частей молекулы, а его полипропиленоксидный блок проявляет сродство к липидному бислою [9]. В буферном растворе плуроник L121 образует наноразмерные мицеллы, которые, по нашим данным, характеризуются слабоотрицательным дзета-потенциалом (около -6.7 мВ).

Установлено, что обработка клеток HeLa плуроником L121 сопровождается заметным сдвигом поверхностного заряда клеток в положительную область пропорционально концентрации плуроника (рис. 3). Наблюдаемые изменения можно объяснить адсорбцией неионогенного плуроника на поверхности клеток и его встраиванием в мембрану своим гидрофобным блоком [10], что приводит к изменению потенциала двойного электрического слоя на поверхности клеток. Обработка клеток плуроником L121 в использованном диапазоне концентраций не приво-

дила к полной нейтрализации заряда клеток, как это наблюдалось в случае поликатионов. Сходные изменения дзета-потенциала клеток в присутствии полимеров наблюдали в клетках других типов (MCF-7, мононуклеарные клетки крови), что указывает на неспецифический характер взаимодействия использованных полимеров с клетками человека.

ВЫВОДЫ

Методом ДРС определены величины дзета-потенциала клеток крови (эритроциты, мононуклеары) и клеток линий HeLa и MCF-7. Показана возможность выявления на поверхности клеток фосфатидилсерина, раннего маркера апоптоза и снижения жизнеспособности клеток, по увеличению их суммарного отрицательного заряда. Добавление поликатионов и амфифильного плуроника L121 нейтрализует отрицательный дзета-потенциал клеток пропорционально концентрации полимеров.

Полученные результаты показывают, что метод динамического рассеяния света можно применять для изучения свойств мембран животных клеток, изменений их биохимического состава и взаимодействия с мембранотропными полимерами в различных условиях. Метод ДРС может использоваться в клеточной биологии для анализа состояния мембран различных клеток, оценки действия лекарственных средств и мембранотропных материалов. ●

Работа частично финансировалась в рамках проекта по развитию инновационной инфраструктуры в Казанском (Приволжском) федеральном университете по постановлению Правительства Российской Федерации № 219.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fernie A.R., Trethewey R.N., Krotzky A.J., Willmitzer L. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2004. V. 5. P. 763–769.
2. Boros L.G., Cascante M., Lee W.N. // Drug discovery today. 2002. V. 7. P. 364–372.
3. Fang J., Palanisami A., Rajapakshe K. // Biosensors. 2011. V. 1. P. 13–22.
4. Kuo Y.-C., Lin T.-W. // J. Phys. Chem. B. 2006. V. 110. № 5. P. 2202–2208.
5. Wilson W., Wade M., Holman S., Champlin F.R. // J. Microbiol. Meth. 2001. V. 43. P. 153–164.
6. Eylar E.H., Madoff M.A., Brody O.V., Oncley J.L. // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. P. 1992–2000.
7. Pack D.W., Hoffman A.S., Stayton S.P., Stayton P.S. // Nat. Rev. Drug Disc. 2005. V. 4. P. 581–593.
8. Firestone M.A., Wolf A.C., Seifert S. // Biomacromolecules. 2003. V. 4. P. 1539–1549.
9. Bryskhe K., Schillen K., Loéfroth J.E., Olsson U. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2001. V. 3. P. 1303–1309.
10. Erukova V.Yu., Krylova O.O., Antonenko Yu.N., Melik-Nubarov N.S. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1468. P. 73–86.

УДК 616.31-006.61-085-277.3

Таргетная терапия – новый подход в лечении местно-распространенного рака орофарингеальной зоны

Л. З. Вельшер^{1,2}, А. А. Космынин^{1*}, М. Ю. Бяхов^{1,2}, Т. К. Дудицкая^{1,2}, Д. Н. Решетов^{1,2}¹ГОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет, кафедра онкологии и лучевой терапии, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20/1²Онкологический центр ОАО «РЖД», 129128, Москва, ул. Будайская, 2

*E-mail: kosmos-83@list.ru

Поступила в редакцию 27.07.2011 г.

РЕФЕРАТ Представлены данные клинического обследования 48 человек (42 мужчины, 6 женщины) трудоспособного возраста (40–75 лет), больных местно-распространенным раком орофарингеальной области. Применен современный подход к лечению этих больных – таргетная терапия в неoadъювантном режиме с учетом биологического профиля опухоли. Применение gefитиниба приводило к выраженному противоопухолевому эффекту у 90.5% больных, против 56.5% без использования этого препарата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА орофарингеальный рак, таргетная терапия, качество жизни, gefитиниб.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПРГШ – плоскоклеточный рак головы и шеи; EGFR (epidermal growth factor receptor) – рецептор эпидермального фактора роста.

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные опухоли области головы и шеи в общей структуре онкологической заболеваемости составляют 20%. Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) занимает одно из ведущих мест по распространенности среди злокачественных новообразований, а число заболевших ежегодно превышает 600 000 [1]. В России каждый год регистрируется более 80 000 больных с данной патологией, из них 3.5% – больные с новообразованиями слизистой оболочки полости рта и глотки. На территории Российской Федерации заболеваемость раком орофарингеальной зоны за 1997–2007 гг. увеличилась с 24.7 до 29.6% на 100 000 населения. Более чем в 70% случаев за медицинской помощью обращаются уже с запущенными формами заболевания (стадии III, IV), при которых проведение радикального оперативного вмешательства невозможно или резко ограничено [1, 2]. Доля запущенных случаев рака орофарингеальной зоны выросла с 26.4 до 31.2%, а летальность от него составляет 15.6% [3]. Острота и актуальность этой проблемы не вызывают сомнения, так как затрагивают лиц трудоспособного возраста.

Применение хирургического вмешательства у больных этой категории требует проведения расширенно-комбинированных операций, которые носят «калечащий» характер, что значительно ухудшает качество жизни. Лучевая терапия в сочетании с оперативным лечением либо в самостоятельном

виде с использованием высоких доз облучения сопровождается развитием тяжелых осложнений (ксеростомия, дисфагия, мукозиты и др.), что значительно ограничивает возможности ее применения, затрудняет психо-социальную адаптацию и реабилитацию этих больных.

Кроме того, при комбинированной терапии у 10–30% больных ПРГШ возникает местный рецидив, в том числе и у тех, у которых края резекции были гистологически нормальными, что указывает на возможное субклиническое системное распространение опухоли еще до стадии генерализации. В связи с этим возрастает роль комплексного подхода с использованием не только хирургии и лучевой терапии, но и лекарственных методов, т.е. системного воздействия на опухолевые клетки.

Лекарственная терапия при плоскоклеточном раке орофарингеальной области долгое время применялась с паллиативной целью при неоперабельных распространенных опухолевых процессах, чаще рецидивного характера, с наличием отдаленных метастазов.

Все современные схемы полихимиотерапии, в которых используются препараты платины, 5-фторурацила (5-ФУ), обеспечивают уровень объективных ответов 57–80%, таксанов – до 36–40%, не увеличивая общей продолжительности жизни больных [4–9]. Низкая чувствительность опухолей заставляет искать новые возможности системной терапии.

Новейший этап истории противоопухолевой терапии отсчитывается с середины 1990-х годов, хотя его основы были заложены достижениями фундаментальной биологии двух предшествующих десятилетий [10]. В этих исследованиях раскрыты молекулярные механизмы регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, что позволило получить лекарственные средства с принципиально новым механизмом действия [11].

В отличие от классических цитостатиков, действие которых основано на нарушении клеточного цикла, препараты таргетной терапии целенаправленно воздействуют на молекулярные мишени, блокируя тем самым более ранние этапы канцерогенеза. Среди них есть и открывшие новый этап в лечении больных плоскоклеточным раком орофарингеальной области [2, 10, 12–14].

Основной мишенью при ПРГШ служит рецептор эпидермального фактора роста (EGFR). Гиперэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста отмечается приблизительно в 90–100% случаев плоскоклеточного рака орофарингеальной зоны и ассоциирована с худшим прогнозом, низкой дифференцированностью опухоли, снижением общей и безрецидивной выживаемости [15–17].

В 2004 г. тремя группами исследователей опубликованы данные о том, что мутации в тирозинкиназном домене EGFR приводят к повышенной чувствительности опухолей к ингибиторам тирозинкиназы EGFR – гефитинибу и эрлотинибу [12, 16, 18]. Большинство мутаций, выявленных в гене EGFR, это или делеции в экзоне 19 (29 из 56.52% случаев), которые приводят к потере четырех аминокислотных остатков (лейцин, аргинин, глутаминовая кислота и аланин) в молекуле белка, или точечные замены в экзоне 21, ведущие к замене лейцина в положении 858 аргинином (20 из 56.36% случаев) [12]. Наличие мутации в гене EGFR – важный прогностический фактор, указывающий на вероятность более благоприятного результата при лечении с помощью гефитиниба. Впервые высокая эффективность гефитиниба была показана в случае немелкоклеточного рака легкого с мутацией в гене EGFR: частота объективного ответа составила 84.6% [19–21]. Ввиду того, что гиперэкспрессия EGFR определяется более чем в 80% злокачественных опухолей головы и шеи [22], нами начато изучение эффективности комбинации цисплатина, 5-фторурацила и гефитиниба (Иресса) у больных распространенным (стадии III, IV) плоскоклеточным раком орофарингеальной области с мутацией в EGFR.

Гефитиниб (Иресса) – один из первых ингибиторов тирозинкиназы, введенных в клиническую практику. По химической структуре это производное анили-

нохиназолина. Гефитиниб избирательно и обратимо связывается с АТР-связывающим сайтом тирозинкиназного домена рецептора эпидермального фактора роста и тем самым блокирует его киназную активность, т.е. способность фосфорилировать следующие за ним сигнальные белки, что ведет к ингибированию пролиферативного сигнала [23, 24]. Гефитиниб индуцирует повышение в клетке уровня ингибитора циклинзависимых киназ p27, что ведет к задержке клеточного цикла в фазе G1. Активное изучение гефитиниба проводится в рамках международных клинических исследований. В рамках II фазы одного из клинических исследований применение гефитиниба у 52 больных с рецидивировавшим/метастатическим ПРГШ позволило достичь уровня объективного ответа у 10.6% из них, а уровня контроля над болезнью – у 53%. Половина когорты больных получала гефитиниб как терапию второй линии. Таким образом, медиана безрецидивной и общей выживаемости составила 3.4 и 8.1 мес соответственно. Единственным клинически значимым побочным эффектом была диарея [25].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

С марта 2009 по апрель 2011 г. пролечены 48 больных (42 мужчины, 6 женщин) в возрасте 40–75 лет, средний возраст 57 лет.

Представленная на рис. 1 диаграмма наглядно показывает, что значительную часть больных составляют мужчины трудоспособного возраста. Женщин, страдающих раком орофарингеальной области, в 7 раз меньше, чем мужчин.

По локализации опухолевого поражения больные распределились следующим образом (рис. 2): дно полости рта – 8 (17%), ротоглотка – 18 (37%), гортаноглотка – 12 (25%), подвижная часть языка – 8 (17%), ретромолярная область – 2 (4%). На диаграмме видно, что преобладают новообразования рото- и гортано-

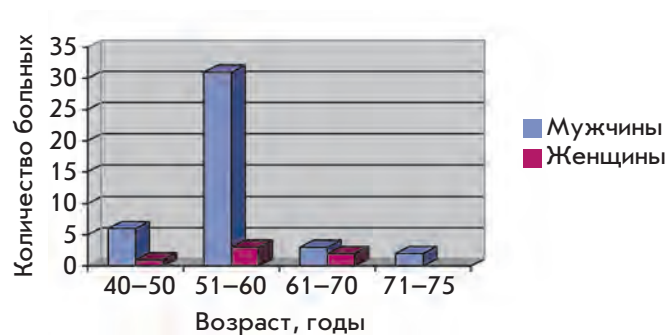


Рис. 1. Распределение больных раком орофарингеальной зоны по возрасту.

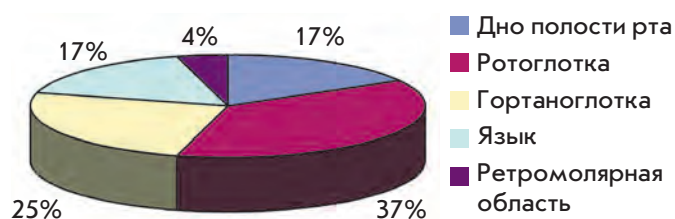


Рис. 2. Распределение больных раком орофарингеальной зоны по локализации первичной опухоли.

глотки, чуть реже встречается рак подвижной части языка и дна полости рта.

Распространенность опухолевого процесса до начала терапии оценивали клиническим осмотром пораженной зоны, а также методом компьютерной томографии и ультразвукового исследования зон регионарного лимфооттока.

У всех больных до начала лечения определяли биологический профиль опухоли, т.е. экспрессию и мутации гена рецептора эпидермального фактора роста. Мутации в гене *EGFR* выявляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), а экспрессию *EGFR* – иммуногистохимическим способом. На ДНК из парафиновых блоков с верифицированной опухолью проводили аллель-специфичную ПЦР с праймерами, специфичными к мутации L858R в гене *EGFR*. Ген *EGFR* дикого типа амплифицируется в тех же условиях с увеличением *Ct* на 7–10 циклов, что позволяет отличать его от мутантного.

Нелеченных больных местно-распространенным (стадии III, IV) плоскоклеточным раком орофарингеальной зоны методом рандомизации распределяли на две группы:

1-я (исследуемая) – цисплатин 100 мг/м² в/в в 1-й день, 5-фторурацил 500 мг/м² в/в 1–5 день (4 цикла с интервалом 21 день) и gefitinib (Иресса) 250 мг per os ежедневно в течение 16 нед;

2-я (контрольная) – цисплатин 100 мг/м² в/в в 1-й день, 5-фторурацил 500 мг/м² в/в 1–5 день (4 цикла с интервалом 21 день).

После завершения четырех циклов оценивали опухолевый ответ клинически и согласно объективным международным критериям RECIST.

Больным, у которых достигалась полная резорбция опухоли, на втором этапе комплексного лечения проводили лучевую терапию по радикальной программе на область первичной опухоли СОД 60–70 Гр и зоны регионарного лимфооттока СОД 30–40 Гр. Больные с частичной регрессией и стабилизацией опухолевого процесса подвергались предоперационной лучевой терапии в объеме СОД 30–40 Гр с последующим оперативным вмешательством.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффект оценен у 44 больных, завершивших лечение. Четверо больных (16.7%) выбыли из исследования из-за возникшей токсичности: у двух (8.3%) проявилась нефротоксичность 3–4-й степени, у двух (8.3%) – гематологическая токсичность 4-й степени. У всех 48 (100%) больных выявлена гиперэкспрессия *EGFR* и только у трех (6.8%) – мутация в *EGFR*.

Проведя сравнительный анализ (таблица) результатов лечения в обеих группах, мы видим, что в исследуемой группе из 21 пролеченного больного у семи (33.3%) достигнута полная клиническая регрессия опухоли, причем у двух из этих семи выявлена мутация в гене *EGFR* (4.5%); у девяти (42.9%) – частичный ответ (регрессия опухоли до 85%); у трех (14.3%) наблюдали стабилизацию процесса (уменьшение опухоли на 18–20%), у двух (9.5%) больных зафиксировано прогрессирование опухолевого процесса. В контрольной группе, получавшей только стандартную химиотерапию, у 13 (56.5%) из 23 больных отмечен частичный ответ (регрессия опухоли до 57%), у 10 (43.5%) зарегистрировали продолжение роста опухоли.

Сравнительный анализ эффективности лечения больных плоскоклеточным раком головы и шеи с применением gefitinib и без него (контрольная группа)

Группа	Число больных	Объективный эффект				Мутация <i>EGFR</i>	
		полный ответ	частичный ответ	стабилизация	прогрессирование	да	нет
1-я (исследуемая)	21	7 (33.3%)	9 (42.9%)	3 (14.3%)	2 (9.5%)	2 (4.5%)	20 (45.5%)
2-я (контрольная)	23	–	13 (56.5%)	–	10 (43.5%)	1 (2.3%)	21 (47.7%)
Итого	100%					3 (6.8%)	41 (93.2%)

ВЫВОДЫ

Нами показано значительное увеличение эффективности лечения больных раком орофарингеальной зоны при использовании таргетной терапии – гефитиниба. Эффект гефитиниба наиболее выражен при наличии мутации в гене *EGFR*. При применении гефитиниба клинический ответ опухоли достигался у 90.5% больных, что вдвое больше, чем при использовании только лишь химиотерапии – 56.5%. Причем в 33.3% случаев радикальный результат достигнут без оперативного вмешательства. Комбинирование таргетной терапии со стандартной химиотерапией позволяет существенно повысить эффективность лечения и улучшить прогноз заболевания. Эти ре-

зультаты создают перспективы применения данной схемы на консервативном этапе лечения (химиолучевом) при более ранних стадиях опухолевого процесса, что позволяет говорить о возможности органосохранного комплексного лечения больных плоскоклеточным раком орофарингеальной зоны. Также в мире продолжают клинические исследования по изучению эффективности таргетных препаратов (эрлотиниб, гефитиниб, цетуксимаб) в комбинации с химиолучевой терапией при плоскоклеточном раке области головы и шеи с мутацией в гене *EGFR*. Это открывает новые «горизонты» в лечении данной категории больных, улучшая качество их жизни и позволяя выполнять органосохранные операции. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stewart B.W., Kleihues P.E. World Cancer Report. Lyon, France: Internat. Agency Res. on Cancer Press, 2003.
2. Venmorven J.B. // J. Clin. Oncol. 2007. V. 25. № 16. P. 2171–2177.
3. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2007 году. М.: ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2008. С. 16.
4. Новик А.А., Камилова Т.А., Цыган В.Н. // Вопр. онкологии. 2003. № 6. С. 695–703.
5. Платинский Л.В., Брюзгин В.В., Блюменберг А.Г. // Рус. мед. журн. 2002. Т. 10. № 24. С. 1116–1118.
6. Подвязников С.О., Бяхов М.Ю. // Современная онкология. 2002. Т. 4. № 3. С. 126–130.
7. Pignon J.P., Bourhis J. // Lancet. 2000. V. 355. P. 949–955.
8. Forastiere A.A. // Semin. Oncol. 1994. V. 21. (Suppl. 8). P. 49–52.
9. Manzione L., Caponigro F., Massa E. // Proc. Amer. Soc. Clin. Oncol. 1999. V. 18. P. 398a.
10. Моисеенко В.М. // Практическая онкология. 2002. № 4. С. 253–261.
11. Копнин Б.П. // Практическая онкология. 2002. № 4. С. 229–235.
12. Paez J.G., Janne P.A., Lee J.C. // Science. 2004. V. 304. P. 1497–1500.
13. Rivera F., Garcia-Castano A., Vega N. // Expert. Rev. Anti-cancer Ther. 2009. V. 9. № 10. P. 1421–1428.
14. Vermorken J.B., Mesia R., Rivera F. // N. Engl. J. Med. 2008. V. 359. № 11. P. 1116–1127.
15. Grandis J.R., Melhem M.F., Gooding W.E. // J. Natl. Cancer Inst. 1998. V. 90. № 11. P. 824–828.
16. Ono M., Kowano M. // Clin. Cancer Res. 2006. V. 12. P. 7242–7251.
17. Vernham G.A., Crowther J.A. // Clin. Otolaryngol. Allied Sci. 1994. V. 19. P. 120–124.
18. Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R. // N. Engl. J. Med. 2004. V. 350. P. 2129–2139.
19. Inoue A., Kobayashi K., Naemondo M. // Eur. J. Cancer 45 (Suppl. 1), 2009. (Abstract 9LBA).
20. Lee J.S., Park K., Kim S.-W. // J. Trobac. Oncol. 4 (Suppl. 1). 2009. (Abstract PRS4).
21. Pao W., Miller V., Zakowski M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 13306–13311.
22. Mitsudomi T., Morita S., Yatabe Y. // Lancet Oncol. 2010. V. 11. № 2. P. 121–128.
23. Albanell J., Rojo F., Averbuch S. // J. Clin. Oncol. 2002. V. 20. P. 110–124.
24. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой химиотерапии. М.: Практическая медицина, 2006. С. 282–283.
25. Cohen J. // Br. J. Cancer. 2007. V. 96. № 3. P. 408–416.

УДК 577.112.6;591.35

Коррекция семаксом долговременных негативных эффектов неонатальной изоляции у белых крыс

М. А. Володина², Е. А. Себенцова¹, Н. Ю. Глазова¹, Д. М. Манченко², Л. С. Иноземцева¹,
О. В. Долотов¹, Л.А. Андреева¹, Н. Г. Левицкая¹, А. А. Каменский², Н. Ф. Мясоедов¹

¹Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Акад. И.В. Курчатова, 2

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

*E-mail: nglevitskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 26.01.2012 г.

РЕФЕРАТ Неблагоприятные воздействия в период раннего неонатального развития вызывают негативные изменения физиологических и нейробиологических функций и приводят к долговременным нарушениям поведения животных. Изучены отставленные эффекты хронического неонатального стресса у белых крыс и оценена возможность их коррекции последующим введением аналога фрагмента АКТГ(4–10) препарата семакс. В качестве стрессогенного воздействия использовали неонатальную изоляцию. Крысят ежедневно отлучали от матери и остального выводка на 5 ч в день в период с 1 по 14 день жизни. Контрольные животные в первые 2 нед. жизни из гнезда не извлекались. С 15 по 28 день жизни половине крыс, перенесших неонатальную изоляцию, ежедневно интраназально вводили семакс в дозе 50 мкг/кг. Остальные животные получали интраназальные инъекции растворителя в те же сроки. Показано, что неонатальная изоляция приводит к замедлению физического развития животных, нарушению метаболических процессов и ослаблению гормонального ответа на острый стресс. Указанные изменения наблюдаются в течение 1–2 мес. жизни. Введение семакса крысам, подвергавшимся неонатальной изоляции, ослабляло влияние изоляции на массу тела животных, уменьшало метаболические нарушения и приводило к увеличению вызванного стрессом выброса кортикостерона до контрольных значений. Следовательно, хроническое интраназальное введение семакса после завершения неонатальной изоляции ослабляет негативные эффекты неонатального стресса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА хронический стресс, неонатальная изоляция, семакс, масса тела, кортикостерон, крысы.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АКТГ – адреноректорный гормон; МД – материнская депривация; НИ – неонатальная изоляция.

ВВЕДЕНИЕ

Важная роль неонатального периода жизни в развитии нейрофизиологических механизмов и дальнейшем становлении ментальных функций не вызывает сомнений. Аверсивные воздействия в ранний постнатальный период жизни человека (такие, как потеря родителей, жестокое обращение, отсутствие родительской заботы) приводят к увеличению риска развития психопатологий во взрослом возрасте [1]. Дети, перенесшие в неонатальный период серьезные заболевания, подвергаются многочисленным болевым и стрессогенным воздействиям, которые вызывают не только острые изменения, но и приводят к постоянным структурным и функциональным изменениям в ЦНС [2]. Хотя рядом авторов показана корреляция между неонатальными воздействиями и нарушениями поведения взрослого человека, во-

прос этот остается недостаточно исследованным. Эксперименты на животных с использованием различных аверсивных воздействий позволяют определить зависимость отставленных изменений поведения от срока и природы воздействия и способствуют поиску методов коррекции последствий неонатального стресса. Многочисленные клинические исследования показали, что нарушение социоэмоциональной связи матери и ребенка в первый год жизни является серьезным стрессогенным фактором и в дальнейшем повышает риск развития многих психических заболеваний [1, 3]. Долговременное отлучение детенышей от матери в ранний постнатальный период (неонатальная материнская депривация) также оказывает значительное влияние на поведение и физическое развитие животных разных видов.

Изучению долговременных эффектов неонатальной материнской депривации (МД) посвящено большое число исследований. Показано, что направленность отставленных эффектов хронической МД зависит от длительности ежедневной депривации детенышей. Кратковременная хроническая депривация (15 мин в день в течение первых 1–2 нед. жизни) благоприятно влияла на дальнейшее развитие животных. У крыс, перенесших такое воздействие, отмечалось снижение тревожности и повышение исследовательской активности, а также улучшение способности к обучению [4–6]. Длительное удаление крысят от матери (на 3–6 ч в день в течение первых недель жизни) также вызывает долговременные отставленные изменения поведения животных и рассматривается как модель неонатального стресса. В экспериментах используют две модели материнской депривации. В первом случае крысята одного выводка во время МД находятся вместе. Во втором случае крысята подвергаются неонатальной изоляции (НИ) – детенышей помещают в индивидуальные контейнеры, и они отделены как от матери, так и от остальных крысят. В большинстве экспериментов у животных, подвергавшихся МД, отмечалось повышение уровня тревожности и снижение исследовательской активности [7–9]. Тем не менее в некоторых случаях МД приводила к повышению исследовательской активности животных [10]. Влияние длительной МД на способность животных к обучению также неоднозначно. Разными авторами зарегистрировано как нарушение [11, 12], так и улучшение способности к пространственному обучению у животных, подвергнутых МД в раннем неонатальном периоде [13]. В некоторых работах не наблюдали влияния МД на способность крыс к пространственному обучению [14]. Показано влияние МД и НИ на функционирование гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси. Однако, как и в случае изменений поведения животных, результаты были достаточно противоречивыми. Так, одни авторы сообщали об увеличении вызванного стрессом выброса кортикостерона у крыс, перенесших материнскую депривацию [15, 16], другие отмечали уменьшение этого показателя у животных, подвергавшихся НИ [17–19] или МД [20]. В ряде работ не выявлено изменения реакции на стрессогенные раздражители у животных, перенесших неонатальный стресс [7]. Противоречивость результатов может быть связана с различиями в протоколах экспериментов и возрастом тестируемых животных [18]. Необходима разработка адекватной модели неонатального стресса у животных и дальнейшее изучение отставленных эффектов хронической длительной материнской депривации.

Гептапептид семакс (МЕНFPGP) является аналогом фрагмента АКТГ(4–10), обладающим пролонгированным ноотропным действием [21]. Этот пептид также обладает нейропротекторными и нейротрофическими эффектами [22, 23], оказывает антигипоксическое и антигеморрагическое действие [21, 24]. В настоящее время семакс используется в медицине в качестве ноотропного и нейропротекторного средства [25]. Опыты на животных показали, что хроническое неонатальное введение семакса приводит в дальнейшем к увеличению исследовательского поведения и снижению тревожности крыс. Кроме того, у животных, получавших в неонатальный период семакс, наблюдалось улучшение способности к обучению. Отмеченные изменения носили отставленный долговременный характер [26]. Эффекты неонатального введения семакса были противоположны эффектам неонатального стресса, что позволило нам предположить возможность компенсации негативных последствий неонатального стресса при помощи семакса. Проведенные нами исследования показали, что ежедневная неонатальная изоляция крысят на 5 ч в день в течение 1–2 нед. постнатального развития вызывает долговременные изменения поведения животных. У крыс, подвергавшихся НИ, отмечается увеличение тревожности и снижение исследовательской активности в возрасте 1–2 мес. Хроническое интраназальное введение семакса с 15 по 28 день жизни крыс в значительной степени нормализует эмоциональное состояние животных, перенесших НИ [27].

Цель представленной работы состояла в изучении влияния неонатальной изоляции на показатели физического развития крыс и гормональный ответ на острое стрессогенное воздействие, а также в оценке возможности коррекции эффектов НИ последующим введением семакса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперименты проводили на детенышах нелинейных белых крыс обоего пола. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде и соблюдением 12-часового светового режима дня. Гептапептид семакс (МЕНFPGP) синтезирован в Институте молекулярной генетики РАН.

День рождения крысят принимали за нулевой день жизни. Каждый выводок делили на три группы: группа «контроль», группа «НИ» (животных подвергали неонатальной изоляции), группа «НИ-семакс» (животных подвергали НИ и в дальнейшем вводили семакс). Крысят группы «контроль» в течение первых 2 нед. жизни не вынимали из гнезда. Животных из групп «НИ» и «НИ-семакс» ежедневно с 1 по 14 день жизни на 5 ч помещали в индивидуальные бок-

сы. Во время изоляции детеныши находились в тишине, при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и умеренном освещении. С 15 по 28 день жизни крысам группы «НИ-семакс» ежедневно интраназально вводили водный раствор семакса в дозе 0.05 мг/кг. Крысята групп «контроль» и «НИ» получали эквивалентный объем растворителя в те же сроки. В ходе эксперимента у всех животных регистрировали время открытия глаз и массу тела (с 15 по 28 день жизни – ежедневно, затем 1 раз в неделю). На 15, 30 и 48 дни жизни измеряли содержание глюкозы в крови животных. Для определения уровня глюкозы брали пробу крови из кончика хвоста и измеряли содержание глюкозы при помощи глюкометра (Accu-Chek Performa Nano).

На 42 день жизни оценивали уровень пищевой мотивации животных. Перед экспериментом животных подвергали 20-часовой пищевой депривации. Измеряли содержание глюкозы в крови у голодных животных. Через 30 мин после измерения глюкозы крысу помещали в пустую клетку. После 5 мин адаптации к новым условиям в клетку вносили навеску с кормом. Затем в течение 10 мин регистрировали следующие показатели: латентный период начала приема пищи, продолжительность потребления корма и количество съеденного корма. Затем крысу помещали в клетку со свободным доступом к пище. Через 30 мин повторно измеряли уровень глюкозы.

На 65 день жизни оценивали изменение уровня кортикостерона в крови крысы в ответ на стрессогенное воздействие. В начале эксперимента крысу помещали в фиксатор и брали пробу крови (200 мкл) через надрез на кончике хвоста. Затем животное подвергали неизбежному плаванию в течение 10 мин при температуре 24°C . Через 10 мин после окончания стрессогенного воздействия крысу повторно помещали в фиксатор и брали вторую пробу крови, после чего животное помещали в домашнюю клетку. Через 60 мин после окончания плавания крыс декапитировали и получали пробу крови. Пробу выдерживали в течение 20 мин при 37°C , затем 60 мин при 4°C . Далее пробы центрифугировали (10 мин, 5000 об/мин) и отбирали сыворотку. В дальнейшем в образцах сыворотки определяли уровень кортикостерона с помощью набора для определения кортикостерона в биологических жидкостях (Corticosterone EIA Kit, Catalog № ADI-900-097, Enzo).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на животных обоего пола. Нами зарегистрировано значимое влияние фактора «пол» только на изменение массы тела крыс. Остальные параметры у самцов и самок достоверно не различались. Применение двухфакторного метода ANOVA (фактор 1 – группа, фактор 2 – пол) при ана-

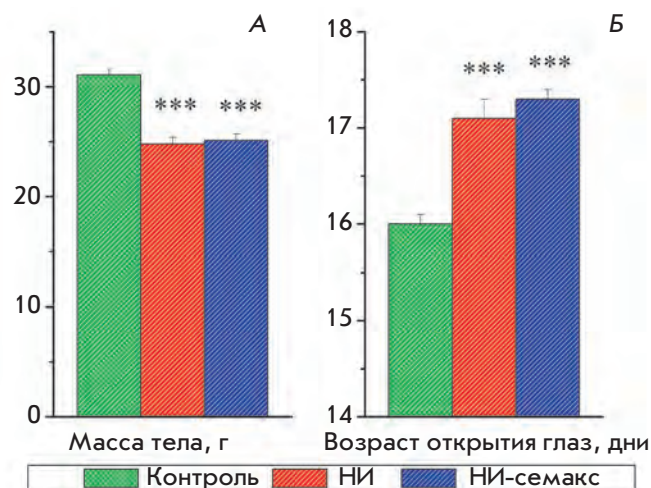


Рис. 1. Влияние неонатальной изоляции на массу тела крыс в возрасте 15 дней (А) и время открытия глаз (Б). Число животных в группах – 81/74/77. Значимые отличия от контроля отмечены *** ($p < 0.001$).

лизе изменения массы тела крыс в течение первых 2 мес жизни показало значимое влияние фактора «группа» ($F_{2,48} = 3.49, p < 0.04$) и фактора «пол» ($F_{1,48} = 34.91, p < 0.000001$). Однако значимого взаимодействия этих факторов отмечено не было ($F_{2,48} = 0.33, p = 0.72$). Сопоставление результатов, полученных в подгруппах самцов и самок, не выявило статистически значимых различий влияния НИ и семакса на животных разного пола, что позволяет нам представить результаты, полученные на всей группе крыс.

Оценка параметров физического развития животных, подвергавшихся ежедневной изоляции с 1 по 14 день жизни, показала, что использованное воздействие приводит к снижению массы тела крысят в возрасте 15 дней ($F_{2,229} = 39.60, p < 0.0001$; рис. 1А) и более позднему открытию глаз ($F_{2,136} = 25.83, p < 0.0001$; рис. 1Б). Кроме того, через 1 сут после последней НИ у крыс, перенесших неонатальный стресс, зарегистрировано значимое снижение уровня глюкозы в крови по сравнению с контролем ($F_{2,107} = 9.53, p < 0.0001$; рис. 2). Крысят, перенесших НИ, делили на группы «НИ» и «НИ-семакс» на 15 день жизни случайным образом. Животные этих двух групп не отличались между собой по массе тела и уровню глюкозы на 15 день жизни, а также по возрасту открытия глаз (рис. 1, 2).

С 15 по 28 день жизни половине крысят, перенесших НИ, ежедневно интраназально вводили раствор семакса (группа «НИ-семакс»). Остальным животным (группа «НИ»), так же как и контрольным, вводили дистиллированную воду. В течение этого периода у крыс групп «НИ» и «НИ-семакс» сохранялось отставание по массе тела от контроля ($F_{2,84} = 27.75$,

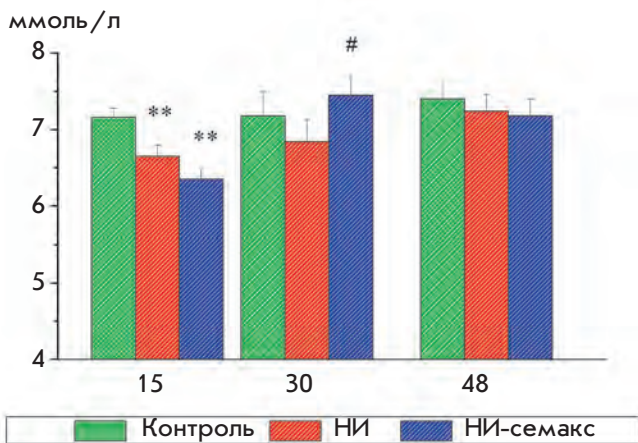


Рис. 2. Содержание глюкозы в крови крыс. По оси X – возраст животных (дни), по оси Y – уровень глюкозы (ммоль/л). Число животных в группах: для возраста 15 дней – 38/35/38; для возраста 30 и 48 дней – 12/11/11. Значимые отличия от контроля отмечены ** ($p < 0.01$), от группы «НИ» – # ($p < 0.05$).

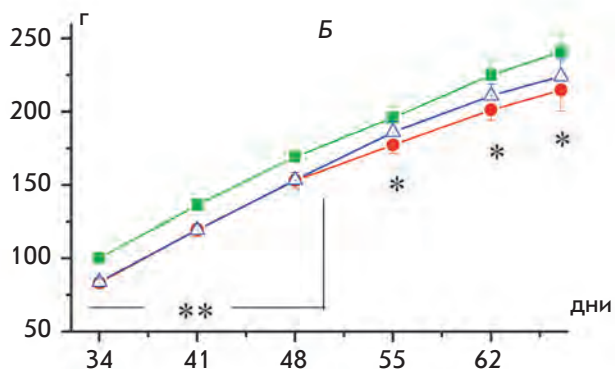
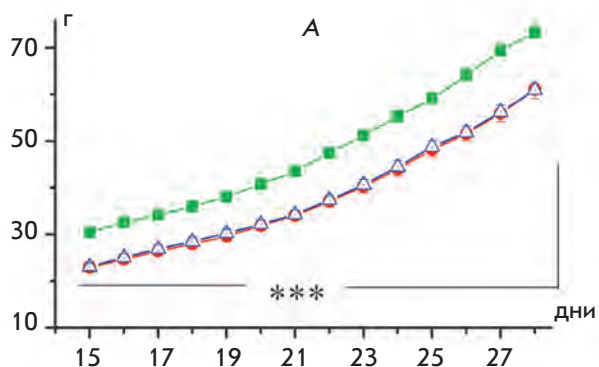


Рис. 3. Изменение массы тела крыс в течение первого (А) и второго (Б) месяцев жизни. По оси X – возраст крыс (дни), по оси Y – масса тела (г). Число животных в группах – 32/29/28. Значимые отличия от контроля отмечены * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) и *** ($p < 0.001$).

$p < 0.0001$; рис. 3А). Значимых отличий между группами «НИ» и «НИ-семакс» не зарегистрировано ($F_{1,53} = 0.03, p > 0.85$). У животных группы «НИ» отставание массы тела от контроля сохранялось до 65 дня жизни ($F_{1,25} = 4.63, p < 0.04$). Масса тела крыс группы «НИ-семакс» до 48 дня жизни была достоверно ниже, чем в контроле, в дальнейшем значимых отличий не зарегистрировано ($F_{1,26} = 2.87, p > 0.10$; рис. 3Б).

Оценка уровня глюкозы в крови крыс в возрасте 30 дней не выявила значимых различий между группами по этому показателю ($F_{2,32} = 1.09, p > 0.25$), хотя содержание глюкозы в крови крыс группы «НИ» было несколько ниже контрольных значений. Дальнейший анализ показал, что величина этого показателя в группе «НИ-семакс» была достоверно выше, чем в группе «НИ» ($p < 0.02$ по критерию χ^2). В возрасте 48 дней значимых отличий между группами по содержанию глюкозы отмечено не было ($F_{2,31} = 0.74, p > 0.50$) (рис. 2).

На 42 день жизни оценивали уровень пищевой мотивации животных. У крыс группы «НИ» показатели, характеризующие уровень пищевой мотивации, не отличались от контрольных значений. В группе животных, получавших инъекции семакса, наблюдалось снижение латентного периода начала потребления пищи, увеличение продолжительности потребления пищи и количества съеденного за время эксперимента корма относительно контроля и группы «НИ» ($F_{2,31} > 3.3, p < 0.05$) (рис. 4). Отмеченные изменения свидетельствуют о повышенной пищевой

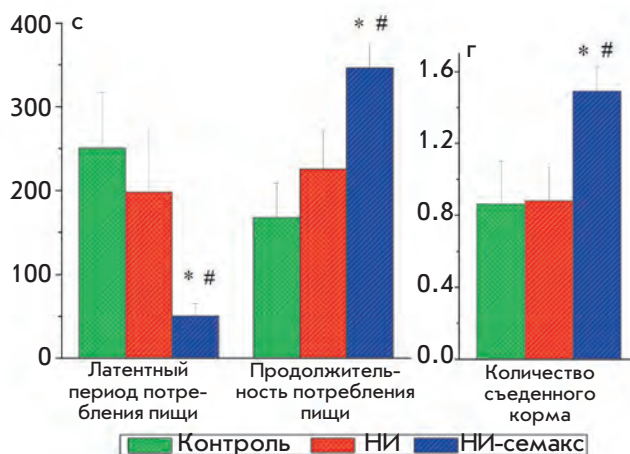


Рис. 4. Параметры, характеризующие уровень пищевой мотивации крыс в возрасте 42 дней. Перед экспериментом крыс подвергали 20-часовой пищевой депривации. Число животных в группах – 12/11/11. Значимые отличия от контроля отмечены * ($p < 0.05$), от группы «НИ» – # ($p < 0.05$).

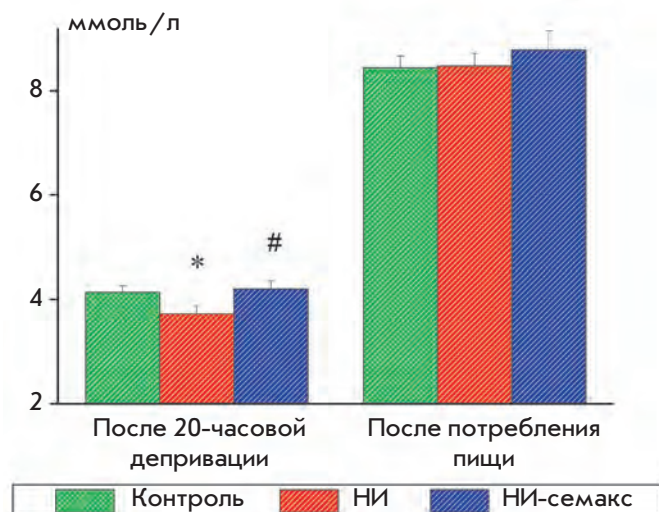


Рис. 5. Содержание глюкозы в крови крыс, перенесших 20-часовую пищевую депривацию, до и после потребления пищи. По оси Y – уровень глюкозы в крови крыс (ммоль/л). Число животных в группах – 12/11/11. Значимые отличия от контроля отмечены * ($p < 0.05$), от группы «НИ» – # ($p < 0.05$).

мотивации у животных группы «НИ-семакс». Следовательно, перенесенная неонатальная изоляция не влияла на уровень пищевой мотивации крыс, а введение семакса крысам, ранее перенесшим НИ, приводило к увеличению пищевой мотивации.

Измерение уровня глюкозы в крови крыс показало, что после пищевой депривации в течение 24 ч величина этого показателя у крыс группы «НИ» была статистически значимо ниже, чем в контроле и в группе «НИ-семакс» ($F_{2,31} = 3.32, p < 0.05$). Уровень глюкозы после пищевой депривации у животных группы «НИ-семакс» был таким же, как в контроле. При повторном измерении (после приема пищи) значимых различий между группами по этому показателю не зарегистрировано ($F_{2,31} = 0.46, p > 0.60$) (рис. 5). Таким образом, неонатальная изоляция приводила к снижению уровня глюкозы в крови в условиях пищевой депривации. Введение семакса снимало эффект изоляции на данный показатель.

На 65 день жизни оценивали изменение уровня кортикостерона в крови крысы в ответ на стрессогенное воздействие. Базальный уровень кортикостерона у крыс, перенесших НИ, был ниже контрольных значений, однако это отличие не достигало уровня статистической значимости ($p > 0.05$). Через 10 мин после стрессогенного воздействия уровень кортикостерона в крови крыс группы «НИ» был значимо ниже, чем в контрольной группе и группе

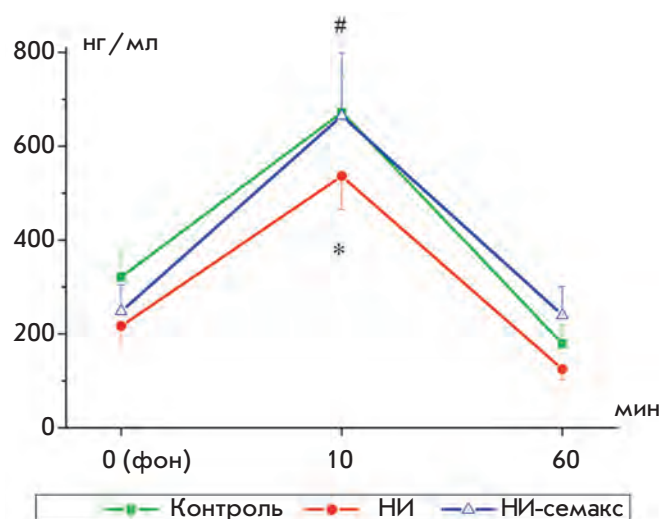


Рис. 6. Изменение уровня кортикостерона в крови крыс в ответ на острое стрессогенное воздействие. По оси X – время от начала стрессогенного воздействия (мин), по оси Y – содержание кортикостерона в сыворотке крови (нг/мл). Число животных в группах – 13/12/11. Значимые отличия от контроля отмечены * ($p < 0.05$), от группы «НИ» – # ($p < 0.05$).

«НИ-семакс» ($p < 0.05$ по критерию χ^2). Через 1 ч после стресса достоверных отличий между группами по этому показателю отмечено не было (рис. 6). Таким образом, неонатальная изоляция приводила к снижению вызванного стрессом выброса кортикостерона, а введение семакса снимало эффект изоляции, возвращая показатель к контрольному уровню.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенных нами экспериментах крысят с 1 по 14 день жизни изолировали от матери и оставшего выводка на 5 ч в день. Известно, что у грызунов в период раннего неонатального развития (первые 2 нед. жизни) ослаблена реакция гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы на стрессогенные воздействия умеренной интенсивности – стресс-гипореактивный период. Такое подавление стрессорного ответа важно для нормального развития нервной системы, оно обеспечивается специфическим материнским поведением. Показано, что отделение детенышей от матери ослабляет блокаду гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, характерную для неонатального периода жизни [28, 29]. Использованное нами воздействие включало ежедневную 5-часовую пищевую депривацию, холодовой стресс и отсутствие контакта с матерью, т.е. представляло собой сочетание физического

и эмоционального стресса высокой интенсивности. Кроме того, как уже сказано выше, отлучение детенышей от матери приводит к ослаблению неонатальной стресс-гипореактивности. Таким образом, примененное нами воздействие было стрессогенным фактором высокой интенсивности, и использованную модель можно рассматривать как модель неонатального стресса.

Нами показано, что хроническая НИ в период с 1 по 14 день жизни крыс приводит к задержке открытия глаз, что свидетельствует о замедлении физического развития. Аналогичные данные получены ранее при изучении влияния МД [30, 31]. Другой показатель, характеризующий физическое развитие животных, – изменение массы тела. В использованной нами модели НИ приводила к замедлению соматического роста крысят, причем отличие от контрольных значений сохранялось в течение всего периода регистрации, т.е. по крайней мере до 2 мес. жизни. Опубликованные данные о влиянии МД на массу тела животных неоднозначны. В большинстве работ не зарегистрировано изменений данного показателя [32, 33], однако, в ряде случаев отмечено снижение веса детенышей, перенесших МД [19, 34, 35]. Такое различие эффектов, вероятно, объясняется разными условиями, в которых находились детеныши в период депривации. Так, в работе, посвященной изучению эффектов неонатальной изоляции [36], было показано, что НИ при температуре 30°C не влияет на массу тела животных, в то время как НИ при 22°C приводит к снижению массы тела и уменьшению скорости роста. В наших экспериментах в течение процедуры НИ детеныши находились при температуре 24–26°C. Вероятно, важную роль в развитии эффектов НИ на физическое развитие крысят играет снижение температуры тела в результате изоляции детенышей от матери и остального выводка. Кроме того, показано, что материнская депривация приводит к подавлению клеточного ответа на три основных трофических гормона – гормон роста, пролактин и инсулин. Такие изменения могут приводить к замедлению соматического роста [37].

Таким образом, ежедневная изоляция в течение первых 2 нед. жизни приводила к замедлению физического развития крысят, которое сохранялось до 65-го дня. Интраназальные инъекции семакса крысятам в возрасте 3–4 нед. ослабляли влияние НИ на массу тела животных, приближая показатели к контрольному уровню в возрасте 55–65 дней. В основе компенсирующего влияния пептида на массу тела крыс, вероятно, лежит усиление пищевой мотивации стрессированных животных, получавших семакс. В данном случае повышение пищевой мотивации можно рассматривать как адаптивную реакцию организма

в ответ на снижение массы тела, вызванное неонатальной изоляцией.

Нами зарегистрировано значимое снижение уровня глюкозы в крови крыс, перенесших неонатальную изоляцию, в возрасте 15 дней. Уровень глюкозы измеряли через 24 ч после последней процедуры изоляции, т.е. к моменту взятия пробы крысята в течение 1 сут находились в контакте с матерью. Следовательно, наблюдаемое снижение уровня глюкозы в крови нельзя объяснить пищевой депривацией. В возрасте 30 и 48 дней у подвергавшихся НИ животных со свободным доступом к пище уровень глюкозы значимо не отличается от контрольных значений. Однако в условиях пищевой депривации у крыс, перенесших НИ, отмечалось уменьшение содержания глюкозы относительно контроля. Полученные данные свидетельствуют о том, что неонатальная изоляция приводит к долговременным нарушениям метаболических процессов в организме крыс. Введение семакса животным, перенесшим НИ, приводило к повышению уровня глюкозы в крови как в условиях свободного доступа к пище, так и в условиях пищевой депривации, что свидетельствует о нормализующем влиянии пептида. Известно, что поддержание физиологического уровня глюкозы в крови необходимо для нормального развития мозга млекопитающих. Гипогликемия в период развития нервной системы может приводить к нарушению как когнитивных функций, так и эмоционального статуса. Такие нарушения не исчезают с нормализацией уровня глюкозы, а могут сохраняться во взрослом возрасте [38]. Ранее нами было показано, что НИ в течение 1–2 нед. жизни вызывает долговременные изменения поведения животных: у крыс, перенесших такое воздействие, отмечается увеличение тревожности и снижение исследовательской активности в возрасте 1–2 мес. Последующее введение семакса в значительной степени нормализует эмоциональное состояние животных, подвергавшихся НИ [27]. Ослабление метаболических нарушений, вызванных НИ, может быть одним из механизмов позитивного влияния семакса на эмоциональный статус животных, перенесших неонатальный стресс.

При изучении влияния неонатального стресса на уровень кортикостерона в крови было показано, что НИ не влияет на базальный уровень этого гормона, но приводит к снижению выброса кортикостерона в ответ на острое стрессогенное воздействие. В большинстве исследований, проведенных ранее, также не наблюдали влияния МД на базальный уровень кортикостерона [33, 39]. Опубликованные данные по влиянию МД на вызванный стрессом выброс кортикостерона противоречивы. Следует

отметить, что большинство работ посвящено изучению эффектов материнской депривации, а не неонатальной изоляции, чем могут быть обусловлены различия в результатах. Сопоставление эффектов МД и НИ, проведенное Rees и соавт. [18], показало, что в то время как МД не влияет на базальный и вызванный стрессом выброс кортикостерона, НИ приводит к снижению вызванного стрессом выброса кортикостерона. Сниженный гормональный ответ на стресс у животных, подвергавшихся неонатальной изоляции, может быть связан с повторными эпизодами стресса, которые перенесли эти крысы, что приводило к многократному выбросу кортикостерона. Повторяющаяся активация гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы в ранний неонатальный период может привести либо к истощению этой системы, либо к увеличению эффективности отрицательной обратной связи [17, 35]. Введение семакса крысам, подвергавшимся НИ, увеличивало уровень вызванного стрессом выброса кортикостерона до контрольных значений. Следовательно, последующее введение пептида нормализовало нарушенный неонатальной изоляцией гормональный ответ на стрессогенное воздействие.

Ранее мы показали, что ежедневная неонатальная изоляция детенышей белых крыс на 5 ч в день с 1 по 14 день жизни приводит к долговременным изменениям поведения животных [27]. В настоящей работе показано, что использованное неонатальное стрессогенное воздействие также приводит к замедлению физического развития животных, нарушению метаболических процессов и ослаблению гормонального ответа на острый стресс. Указанные изменения наблюдаются в течение 1–2 мес. жизни, т.е. носят отставленный долговременный характер. Хроническое интраназальное введение семакса после завершения процедуры неонатальной изоляции ослабляет негативные эффекты неонатального стресса. Полученные результаты могут послужить основой для расширения спектра клинического применения препарата семакс, в частности для лечения патологий у детей в ранний постнатальный период. ●

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК № П1057), Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и РФФИ (грант № 11-04-01329).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Roman E., Gustafsson L., Berg M., Nylander I. // *Horm Behav.* 2006. V. 50. № 5. P. 736–747.
- Anand K.J., Scalzo F.M. // *Biol. Neonate.* 2000. V. 77. № 2. P. 69–82.
- Russek L.G., Schwartz G.E. // *J. Behav. Med.* 1997. V. 20. № 1. P. 1–13.
- Cannizzaro C., Plescia F., Martire M., Gagliano M., Cannizzaro G., Mantia G., Cannizzaro E. // *Behav. Brain Res.* 2006. V. 169. № 1. P. 128–136.
- Maccari S., Piazza P.V., Kabbaj M., Barbazanges A., Simon H., Le Moal M. // *J. Neurosci.* 1995. V. 15. № 1. P. 110–116.
- Vallee M., Mayo W., Dellu F., Le Moal M., Simon H., Maccari S. // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. № 7. P. 2626–2636.
- Daniels W.M., Pietersen C.Y., Carstens M.E., Stein D.J. // *Metab. Brain Dis.* 2004. V. 19. P. 3–14.
- Lambas-Secas L., Mnie-Filali O., Certin V., Faure C., Lemoine L., Zimmer L., Haddjeri N. // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2009. V. 33. № 2. P. 262–268.
- Spivey J., Barrett D., Padilla E., Gonzalez-Lima F. // *Behav. Processes.* 2008. V. 79. № 1. P. 59–65.
- Colorado R.A., Shumake J., Conejo N.M., Gonzalez-Pardo H., Gonzalez-Lima F. // *Behav. Processes.* 2006. V. 71. № 1. P. 51–58.
- Mello P.B., Benetti F., Cammarota M., Izquierdo I. // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2009. V. 92. № 3. P. 364–369.
- Zhu X., Li T., Peng S. // *Behav. Brain Res.* 2010. V. 209. № 2. P. 281–288.
- Pryce C.R., Feldon J. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2003. V. 27. P. 57–71.
- Lévy F., Melo A.I., Galef B.G., Madden M., Fleming A.S. // *Dev. Psychobiol.* 2003. V. 43. № 3. P. 177–191.
- Liu D., Caldji C., Sharma S., Plotsky P.M., Meaney M.J. // *J. Neuroendocrinol.* 2000. V. 12. P. 5–12.
- Plotsky P.M., Thrivirkaman K.V., Nemeroff C.B. // *Neuropsychopharmacology.* 2005. V. 30. P. 2192–2204.
- Faure J., Uys J.D., Marais L., Stein D.J., Daniels W.M. // *Metab. Brain Dis.* 2006. V. 21. № 2–3. P. 181–188.
- Rees S.L., Steiner M., Fleming A.S. // *Behav. Brain Res.* 2006. V. 175. № 2. P. 383–391.
- Ruedi-Bettschen D., Zhang W., Russig H., Fergert B., Weston A., Pedersen E.M., Feldon J., Pryce C.R. // *Eur. J. Neurosci.* 2006. V. 24. № 10. P. 2879–2893.
- Marin M.T., Planeta C.S. // *Brain Res.* 2004. V. 1013. P. 83–90.
- Ashmarin I.P., Nezavibatko V.N., Levitskaya N.G., Koshelev V.B., Kamensky A.A. // *Neurosci. Res. Commun.* 1995. V. 16. № 2. P. 105–112.
- Левицкая Н.Г., Себенцова Е.А., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. // *Физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2002. Т. 88. № 11. С. 1369–1377.
- Dolotov O.V., Karpenko E.A., Inozemtseva L.S., Seredenina T.S., Levitskaya N.G., Rozyczka J., Dubynina E.V., Novosadova E.V., Andreeva L.A., Alfeeva L.Yu., et al. // *Brain Res.* 2006. V. 1117. № 1. P. 54–60.
- Каплан А.Я., Кошелев В.Б., Незавибадько В.Н., Ашмарин И.П. // *Физиология человека.* 1992. Т. 18. № 5. С. 104–107.
- Ашмарин И.П., Незавибадько В.Н., Мясоедов Н.Ф., Каменский А.А., Гривенников И.А., Пономарева-Степная М.А., Андреева Л.А., Каплан А.Я., Кошелев В.Б., Рясина Т.В. // *Журн. Внд им. И.П. Павлова.* 1997. Т. 47. № 3. С. 420–430.
- Себенцова Е.А., Денисенко А.В., Левицкая Н.Г., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. // *Журн. Внд им. И.П. Павлова.* 2005. Т. 55. № 2. С. 213–220.
- Володина М.А., Себенцова Е.А., Глазова Н.Ю., Левицкая

- Н.Г., Андреева Л.А., Манченко Д.М., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2011. Т. 152. № 11. С. 491–494.
28. Faturi C.B., Tiba P.A., Kawakami S.E., Catallani B., Kerstens M., Suchecki D. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2010. V. 34. № 6. P. 821–834.
29. Schmidt M.V., Levine S., Alam S.J. // *Neuroendocrinol.* 2006. V. 18. № 11. P. 865–874.
30. Kazl C., Foote L.T., Kim M.J., Koh S. // *Brain Res.* 2009. V. 1285. P. 174–181.
31. Mesquita A.R., Pego J.M., Summavielle T. // *Neuroscience.* 2007. V. 147. № 4. P. 1022–1033.
32. Pascual R., Zamora-Leyn S.P. // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 2007. V. 67. № 4. P. 471–479.
33. Ploj K., Roman E., Nylander I. // *Neuropeptides.* 2003. V. 37. № 3. P. 149–156.
34. Foscolo D.R., Foscolo R.B., Marubayashi U., Reis A.M., Coimbra C.C. // *Metab. Brain Dis.* 2008. V. 23. № 4. P. 375–385.
35. Litvin Y., Tovote P., Pentkowski N.S., Zeyda T., King L.B., Vasconcellos A.J., Dunlap C., Spiess J., Blanchard D.C., Blanchard R.J. // *Horm. Behav.* 2010. V. 58. № 2. P. 241–249.
36. Marmendal M., Eriksson C.J., Fahlke C. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2006. V. 85. № 3. P. 535–544.
37. Kuhn C.M., Schanberg S.M. // *Int. J. Dev. Neurosci.* 1998. V. 16. № 3–4. P. 261–270.
38. Moore H., Craft T.K., Grimaldi L.M. // *Brain Behav. Immun.* 2010. V. 24. № 5. P. 839–849.
39. Lippmann M., Bress A., Nemeroff C.B., Plotsky P.M., Monteggia L.M. // *Eur. J. Neurosci.* 2007. V. 25. № 10. P. 3091–3098.

УДК 577.2

Стабильная экспрессия рекомбинантного фактора свертывания крови VIII в клетках СНО с использованием амплификации трансгена, инициированной метотрексатом

Н. А. Орлова^{1,2#}, С. В. Ковнир^{1,2#}, И. И. Воробьев^{1*}, А. С. Юрьев², А. Г. Габиров¹,
А. И. Воробьев²

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

²ФГБУ Гематологический научный центр МЗ и СР РФ, 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 6А

Авторы внесли равный вклад в данную работу.

*E-mail: ptichman@gmail.com

Поступила в редакцию 30.12.2011 г.

РЕФЕРАТ Больные гемофилией А – наследственным нарушением свертывания крови – нуждаются в регулярном применении препаратов фактора свертывания крови VIII. Рекомбинантный фактор VIII, продуцируемый в клетках линий СНО или ВНК, эквивалентен природному фактору VIII плазмы крови и широко используется в современной клинической практике. Получение биосимилярного рекомбинантного фактора VIII требует создания высокопродуктивной клональной клеточной линии и получения моноклональных антител, пригодных для аффинной очистки продукта. Изучена возможность амплификации трансгенов полноразмерного и делеционного вариантов фактора VIII, встроенных под контролем цитомегаловирусного промотора в геном трансфицированных клеток, под действием метотрексата. Установлено, что уровень секреции делеционного варианта фактора VIII в 6.5 раза выше, чем природного FVIII. Амплификация трансгена позволила удвоить уровень секреции делеционного варианта фактора VIII, продуцируемого в поликлональной клеточной популяции, и получить клональную клеточную линию, стабильно секретирующую делеционный вариант фактора VIII (до 0.52 МЕ/мл) при суспензионном культивировании в среде определенного химического состава, не содержащей продуктов животного происхождения. Получены четыре моноклональных антитела, узнающие тяжелую цепь фактора VIII и пригодные для адсорбции делеционного варианта фактора VIII непосредственно из культуральной среды и последующей элюции биологически активного фактора VIII с выходом более 85%. Полученные линия-продуцент и моноклональные антитела могут использоваться для разработки схемы промышленного культивирования и очистки рекомбинантного фактора VIII. В дальнейшем планируется получить более продуктивные клеточные линии при помощи не-вирусных промоторов и укороченной кДНК фактора VIII.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА фактор свертывания крови VIII, фактор свертывания крови VIII с делетированным доменом В, гемофилия А, системы гетерологичной экспрессии рекомбинантных белков.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ FVIII – фактор свертывания крови VIII; rhFVIII – рекомбинантный FVIII человека; BDD-FVIII – FVIII с делецией домена В; MTX – метотрексат; EMCV – вирус энцефаломиокардита; IRES – внутренний сайт связывания рибосомы; DHFR – дигидрофолатредуктаза [КФ 1.5.1.3]; МЕ – международная единица (соответствует содержанию фактора VIII в 1 мл пулированной донорской плазмы); мкАт – моноклональное антитело; ОРС – открытая рамка считывания; PBS – фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Фактор VIII свертывания крови (FVIII) – это неэнзиматический кофактор фактора IXa, который при протеолитической активации образует с фактором IXa плотный нековалентный комплекс, связывающий и активирующий фактор X. Этот комплекс является основным элементом петли положительной обратной связи в каскаде свертывания крови. Дефекты гена FVIII могут приводить к развитию гемофилии А – X-сцепленного рецессивного генетического заболевания, которое встречается примерно у одного из 5000 мужчин.

При гемофилии А эффективна только регулярно проводимая заместительная терапия. Традиционный источник фактора VIII – это плазма донорской крови, количество которой ограничено, а использование в качестве сырья для получения терапевтических белков связано с риском передачи вирусных [1, 2] и прионных [3] инфекций даже после тщательного скрининга заготовленной плазмы и множественных процедур вирус-инактивации. Рекомбинантный фактор VIII человека (rhFVIII) можно экспрессировать в культивируемых клетках млекопитающих, очистить до фармакопейных показателей посредством аффинной хроматографии и трех-четырех стадий обычной хроматографии, подвергнуть вирус-инактивации при помощи обработки детергентом и растворителем, а также наночистки или прогревания. Варианты rhFVIII, допущенные к медицинскому применению, получены с использованием культур клеток яичника китайского хомячка (CHO) или почки новорожденного хомяка (ВНК), они полностью эквивалентны FVIII из донорской плазмы при проведении заместительной терапии.

Основной недостаток существующих методов получения rhFVIII – крайне низкий уровень экспрессии целевого белка, обусловленный его большим размером и сложным набором посттрансляционных модификаций. Природный FVIII человека – гликопротеин с молекулярной массой 170–280 кДа, в основном циркулирующий в кровотоке в форме нековалентного комплекса со своим шапероном – фактором Виллебранда (vWF); концентрация FVIII в плазме составляет около 400 нг/мл. FVIII синтезируется в печени в виде одноцепочечного полипептида, состоящего из доменов A1-A2-B-A3-C1-C2. Зрелый секретируемый белок подвергается протеолитическому расщеплению в области между доменами B и A3 и образует гетеродимер, состоящий из тяжелой (домены A1-A2-B, 90–200 кДа) и легкой цепи (домены A3-C1-C2, 80 кДа) [4]. При удалении домена B, составляющего значительную часть молекулы FVIII, удельная прокоагулянтная активность FVIII и его период полураспада в плазме крови практически не снижаются [5].

Замена домена B на короткий линкерный пептид, названный SQ, приводит к существенному повышению продукции FVIII в клетках CHO и полному протеолитическому процессингу белка-предшественника до зрелой двухцепочечной формы [6]. Препарат фактора VIII с делецией домена B (BDD-FVIII) допущен к медицинскому применению под торговым названием «Рефакто»; показатели его эффективности и безопасности сопоставимы с показателями препаратов полноразмерного rhFVIII [7].

В настоящей работе получена линия клеток, секретирующих rhFVIII в существенных количествах, и моноклональные антитела (мкАт), пригодные для аффинной очистки rhFVIII. Вследствие того, что клеточные линии с высоким уровнем продукции FVIII, содержащие в геноме единственную вставку трансгена FVIII, не описаны, нами оценена эффективность плазмидных векторов, кодирующих полноразмерный FVIII или BDD-FVIII и пригодных для амплификации генетической кассеты в геноме стабильно трансфицированных клеток. Типичный уровень продукции BDD-FVIII клетками линии CHO после амплификации трансгена под действием метотрексата составлял 0.5–1 МЕ/мл по данным [6]; сходный уровень – 0.5–2 МЕ/(1 млн клеток в день), зафиксирован в независимо проведенной работе [8] у наилучшего клонального продуцента BDD-FVIII.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание экспрессионных конструкций

Плазмиду pOptivec/F8 конструировали с использованием вектора pOptivec, полученного путем рециркуляризации линейного вектора pOptivec-TOPO («Invitrogen», США). Плазмиду pOptivec расщепляли эндонуклеазой NotI и лигировали с фрагментом NotI–NotI плазмиды pCMV6-XL4/NM_000132, содержащей полноразмерную кДНК фактора VIII человека («Origene», США). Использовали эндонуклеазы рестрикции и ферменты нуклеинового обмена производства «Fermentas» (Литва) или «СибЭнзим» (Россия).

Для создания плазмиды BDD-FVIII методом ПЦР с использованием праймеров O1KpnIfor, O1Hindrev и O2Hindfor, O2B1prev соответственно (табл. 1) получены фрагменты F1 (479 п.н.) и F2 (933 п.н.), фланкирующие область делеции. Олигонуклеотиды были синтезированы ЗАО «Евроген» (Россия). ПЦР проводили при помощи смеси Tersus polymerase mix (ЗАО «Евроген») на приборе PTC-100 Thermal Cycler («MJ Reseach», США). Очищенные ПЦР-продукты клонировали в вектор pAL-TA («Евроген»), полностью секвенировали области вставки с использованием набора BigDye Terminator v. 3.1 cycle sequencing

Таблица 1. Праймеры, использованные для создания делеционного мутанта FVIII-SQ BDD*

Праймер	Нуклеотидная последовательность
O1KpnIfor	5' <u>GCTGGTACCT</u> CACAGAGAATA-TACA3'
O1HindIIIrev	5' <u>GGAGAAGCTTCTT</u> GGTTCAATG3'
O2HindIIIfor	5' <u>CCAAGCTTCTCC</u> AAAAACCCACCA-GTCTTGAAC3'
O2BpIrev	5' <u>CTGCCCATGCTGAGC</u> AGATAC3'
Odelf	5' <u>GCCACA</u> ACTCAGACTTTTCG3'
8sq4f	5' <u>TGTATTTGATGAGA</u> ACCGAAGC3'
8sq5r	5' <u>GCCACTCTGAGCC</u> CTGTT3'
CMVfor	5' <u>CGCAAATGGGCGG</u> TAGGCGTG3'
8sq15r	5' <u>GAGTTCTTTGTTT</u> CTGAGTGCC3'

*Сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции подчеркнуты.

kit («Applied Biosystems», США) и капиллярного секвенатора ABI PRISM 3730 genetic analyzer («Applied Biosystems»). Данные анализировали при помощи программы Chromas 1.45 («Technelysium Pty Ltd.», Австралия).

Фрагмент F3 целевого гена, соответствующий N-концевой части FVIII, получали рестрикцией плазмиды pCMV6-XL4/NM_000132 эндонуклеазами NotI и KpnI. Сборку фрагментов F1–F3 проводили в векторе pAL-TA с образованием плазмиды pALTA/F123. Для ПЦР-анализа колоний использовали специфичный праймер Odelf и вектор-специфичные праймеры M13for и M13rev.

BpI–BpI-фрагмент плазмиды pOptivec/F8 заменяли фрагментом BpI–BpI плазмиды pALTA/F123 и получали экспрессионную плазмиду pOptivec/F8BDD. ПЦР-анализ колоний вели с использованием двух пар специфических праймеров 8sq4f, 8sq5r и CMVfor, 8sq15r. Открытые рамки считывания (ОРС) полноразмерного FVIII и делеционного варианта BDD-FVIII, а также области основных функциональных элементов экспрессионных конструкций (промотора, участка IRES, терминатора транскрипции) секвенировали с использованием праймеров, приведенных в табл. 2.

Плазмидные ДНК для трансфекции нарабатывали в клетках *Escherichia coli* (штамм Stbl4, #11635018 «Invitrogen»), трансформированных экспрессионными конструкциями. Клетки культивировали в 0.5 л среды ТВ в течение 18 ч, и выделяли плазмиды с использованием набора EndoFree Plasmid MaxiKit («Qiagen», США) по протоколу фирмы-производителя. При получении стабильно транс-

Таблица 2. Праймеры, использованные для секвенирования открытой рамки считывания FVIII

Праймер	Нуклеотидная последовательность
8sq1f	TGATCAGACCAGTCAAAGGGA
8sq2f	GATTGGATGCCACAGGA
8sq3f	GCCCTCAGCGGATTGGT
8sq4f	TGTATTTGATGAGAACCGAAGC
8sq5f	TGCCATTGAACCAAGAAGC
8sq6f	GAGAAACTGGGGACAACCTGC
8sq7f	AGAAAGACTCACATTGATGGCC
8sq8f	ACAAAGTGGTAGTAGGAAAGGGTG
8sq9f	TGAAACAATTCAGACTCCCCT
8sq10f	GACAAGTGCCACAAATTTCAG
8sq11f	TTTGTCCCTGAACGCTTGT
8sq12f	CAGCCCTTATACCGTGGAG
8sq13f	CAGATGGAAGATCCCCTTT
8sq14f	GGATCAATCAATGCCTGGAG
8sq15f	AGGAGTAATGCCTGGAGACC
8sq1re	GCAAGCCAGGGAGGGAC
8sq2re	TGGCAAACATATTGGTAAAGTA
8sq3re	AGGGGAGTCTGACACTTATTGC
8sq4re	GAGCAAATTCCTGTACTGTCACTT
8sq5re	GCCACTCTGAGCCCTGTT
8sq6re	CTTGGGATTTCCACTCTTCTTT
8sq7re	CTGCTGGAAGATGAGAAGAGTT
8sq8re	TGCTGGCTTGTATTAGGAGA
8sq9re	GCCTTGCCAGAGTTTCAG
8sq10re	AGTCAACAAAGCAGGTCCAT
8sq11re	ACTGTCTATTGCTCCAGGTGA
8sq12re	CTGAGAATGGGAATAGGGTGA
8sq13re	GGGTCAGGCACCGAGGA
8sq14re	GGATGCTTCTTGGCAACTGA
8sq15re	GAGTTCTTTGTTTCTGAGTGCC
IRESArev	AGGTTCCGGGCCCTCACATTG

фицированных линий клеток использовали лиnearизованные плазмиды. Продукты рестрикции эндонуклеазой PvuI осаждали этанолом, осадки ДНК растворяли в фосфатно-солевом буфере (PBS) и стерилизовали фильтрацией через 0.22 мкм фильтры («Millipore», США).

Ведение культур клеток

Использовали дефектные по гену *DHFR* клетки CHO DG-44 («Invitrogen»), адаптированные к суспензи-

онному культивированию в среде определенного химического состава. Клетки выращивали в колбах Эрленмейера («VWR Scientific», США) в 30 мл среды CD DG-44 («Invitrogen») с добавлением 8 мМ *L*-глутамина («Invitrogen») и 0.18% сурфактанта Pluronic F-68 («BASF Inc.», США), в CO₂-инкубаторе (37°C, 8% CO₂) при перемешивании на орбитальной качалке с постоянной скоростью 130 об/мин. При каждом пассировании измеряли концентрацию клеток и их жизнеспособность с использованием окрашивания трипановым синим. Клетки пассировали каждые 2–3 дня по достижении культурой плотности 1.2×10^6 живых клеток в 1 мл, суспензию клеток разбавляли свежей средой в соотношении 1 : 4.

Трансфекция и селекция стабильно трансфицированных клеток

Трансфекцию проводили при помощи реагента Lipofectamine 2000 («Invitrogen»), не содержащего компонентов животного происхождения; в каждой реакции использовали 18 мкг линейризованной плазмидной ДНК на 1.5×10^7 клеток в 30 мл культуральной среды. После внесения ДНК клетки культивировали в течение 48 ч без смены среды, затем переносили в селективную среду CD OptiCHO («Invitrogen»), не содержащую нуклеозидов, и культивировали до тех пор, пока доля живых клеток не достигала 90% (10–20 дней). Во время культивирования в селекционной среде клетки пассировали 1 раз в 3 дня или до достижения концентрации живых клеток 3×10^5 клеток/мл. Уровень секреции FVIII определяли через 48 ч после начала трансфекции и по окончании культивирования в селективной среде. Трансфекции клеток каждой плазмидой проводили независимо по 3 раза в одинаковых условиях. Поликлональную популяцию клеток (пул), показавшую максимальную продукцию фактора VIII, использовали для амплификации бицистронной генетической кассеты *FVIII-dhfr* под действием метотрексата (MTX).

Создание моноклональных линий-продуцентов

Отобранный пул стабильно трансфицированных клеток культивировали в присутствии возрастающих концентраций MTX в среде CD OptiCHO с 8 мМ *L*-глутамина. На каждом шаге амплификации клетки культивировали в присутствии MTX в течение 10 дней, а затем еще 4–15 дней до достижения доли живых клеток более 90%. Концентрацию секретированного FVIII измеряли при помощи ИФА по окончании каждого шага амплификации, после чего вдвое увеличивали концентрацию MTX и повторяли процедуру еще 9 раз. Пул клеток-продуцентов с максимальным уровнем секреции FVIII использовали для получения

клональных линий-продуцентов методом предельного разведения (0.5 клетки/лунку). Клетки клонировали в условиях адгезионного культивирования в среде CD CHO-A с 8 мМ аланил-глутамин («Invitrogen»), по 200 мкл среды в каждую лунку планшета при 37°C, 5% CO₂ в течение 21 дня. MTX не включали в состав среды при клонировании и не использовали при дальнейшем культивировании.

Рост одиночных колоний наблюдали и документировали на 10-й и 14 дни культивирования. Выросшие колонии переносили в 48-луночные планшеты и при помощи ИФА осуществляли скрининг кондиционированной среды из лунок, содержащих активно растущие колонии. Клональные линии с наилучшими уровнями секреции продолжали растить в адгезионной культуре и затем реадаптировали к условиям суспензионного культивирования в течение трех последовательных пассажей в лунках 24-, 12- и 6-луночных планшетов, используя среду CD OptiCHO с 8 мМ *L*-глутамин. При помощи ИФА проводили скрининг кондиционированной среды из лунок 6-луночных планшетов. Одну выбранную линию продолжали последовательно пассировать в 3, 15, 100 и 200 мл среды CD OptiCHO.

Препаративное культивирование вели в колбах Эрленмейера объемом 500 мл, содержащих по 200 мл культуральной среды. Клетки засеивали в концентрации 2.5×10^5 клеток/мл, культивировали без замены среды до плотности 3×10^6 клеток/мл (4–5 дней), а затем в течение еще 3 дней с ежедневным добавлением 4 мМ *L*-глутамин и 3 мМ глюкозы. Клетки и клеточный дебрис отделяли от кондиционированной среды центрифугированием (500 *g*, 5 мин) с последующей фильтрацией супернатанта при помощи капсульного фильтра с порами 0.22 мкм («Millipore»). Осветленную среду хранили замороженной до использования.

Иммуноферментный анализ

ИФА проводили согласно [9]. ИФА в режиме «связывание антител» использовали для тестирования моноклональных антител (мкАт) к FVIII, антигеном служил концентрат FVIII из донорской плазмы (любезно предоставленный А.Л. Берковским, Гематологический научный центр МЗ и СР РФ) в количестве 200 нг/лунку в PBS. При измерении концентрации FVIII, секретированного в культуральную среду, в качестве подложки использовали поликлональные антитела к FVIII («LifeSpan BioSciences», США) в количестве 50 нг/лунку; в качестве специфичного антитела – мкАт A2, описанное в разделе «Результаты». В качестве стандарта использовали пулированную донорскую плазму в последовательных разведениях в PBS с 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA).

Тестируемые образцы вносили в лунки без разведения или разведенные в PBS с 1% БСА.

Иммуноблоттинг

Лизаты клеток получали при помощи модифицированного буферного раствора RIPA (50 мМ Трис-HCl, pH 7.4; 1% NP-40; 0.25% дезоксихолата натрия, 150 мМ NaCl, 1 мМ Na-EDTA), содержащего смесь ингибиторов протеаз («Sigma», США). Образцы кондиционированной среды осветляли центрифугированием и концентрировали в 30 раз переосаждением трихлоруксусной кислотой. Образцы нормировали по концентрации суммарного белка, вносили в лунки из расчета 10 мкг белка на лунку и разделяли электрофорезом в 7.5% денатурирующем полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ). Перенос на мембрану, блокирование, гибридизацию и проявление окраски проводили согласно [9]. Использовали мембрану Hybond C Extra («GE Healthcare», США), готовый раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина («Sigma»), мкАт А2 для детекции тяжелой цепи FVIII и мкАт производства «Santa Cruz», США для детекции легкой цепи.

Получение мкАт

Иммунизацию, слияние и клонирование гибридом проводили согласно [9]. Самок мышей линии Balb/c («Harlan Labs», Великобритания) иммунизировали подкожно 100 нг рекомбинантного полноразмерного FVIII (Когенейт ФС производства «Bayer HealthCare LLC», США) в 0.25 мл 0.85% NaCl и 0.25 мл полного адъюванта Фрейнда («Pierce Biotechnology», США). Через 2 и 4 недели после первой инъекции повторно вводили 100 нг антигена в неполном адъюванте Фрейнда. Через 1 неделю после последней инъекции отбирали пробы крови из хвостовых вен мышей, и измеряли уровень специфических антител в сыворотке методом ИФА. Одну мышью с максимальным титром IgG использовали для слияния спленоцитов с клетками миеломы SP2/0 при помощи полиэтиленгликоля (ПЭГ). Клетки после слияния выращивали в селективной среде, рассеивали в лунки 96-луночных планшетов и определяли титр IgG к FVIII. Клетки из лунок с положительным сигналом переносили в лунки 24-луночных планшетов и определяли титр специфических IgG и чувствительность к элюции раствором 50% этиленгликоля в PBS. Клетки из лунок с наивысшими титрами и максимальной чувствительностью к элюции этиленгликолем использовали для клонирования гибридом методом предельного разведения (0.5 клетки/лунку). Гибридомные клоны выращивали, повторно проводили скрининг по указанной выше схеме и клонировали. Выращенные гибридомы использовали для получения кондицио-

нированной культуральной среды (10–100 мл) и получения асцитной жидкости в мышях линии Balb/c, предварительно сенсibilизированных введением пристана («Sigma»). Собранную асцитную жидкость замораживали до дальнейшего использования.

мкАт из асцитной жидкости и кондиционированной среды очищали по одинаковому протоколу – преципитация сульфатом аммония, аффинная хроматография на колонке HiTrap Protein G HP («GE Healthcare») объемом 1 мл, концентрирование элюированных IgG ультрафильтрацией и окончательная очистка, совмещенная с обессоливанием, при помощи гель-фильтрации на колонке Superdex 75 10/300 («GE Healthcare») в растворе PBS.

Иммуносорбенты получали при помощи смолы NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow («GE Healthcare») по инструкции производителя. Связывание антигена проводили методом адсорбции в объеме, для этого аликвоты кондиционированной среды объемом 1 мл в микроцентрифужных пробирках смешивали с аликвотами (0.1 мл) суспензии иммуносорбентов в PBS и инкубировали при перемешивании в течение 1 ч при комнатной температуре. Иммуносорбенты осаждали центрифугированием в течение 15 с, супернатанты обедненной культуральной среды собирали для дальнейшего анализа. Сорбенты промывали тремя порциями по 1 мл PBS, связавшиеся белки элюировали, добавляя 0.15 мл 50% раствора этиленгликоля в PBS и инкубируя в течение 5 мин.

Коагулометрия

Прокоагулянтную активность FVIII определяли при помощи оптического коагулометра ThromboScreen 400c («Pacific Hemostasis», США) и набора реагентов «Фактор VIII-тест» (НПО «Ренам», Россия) в соответствии с протоколом производителя набора с некоторыми изменениями. Образцы культуральной среды разводили перед проведением анализа имидазоловым буферным раствором, элюаты с аффинных колонок разводили в 10–50 раз имидазоловым буферным раствором с 1% БСА. При тестировании образцов культуральной среды к образцу калибровочной плазмы крови добавляли 10% кондиционированной среды, полученной на культуре нетрансфицированных клеток. При тестировании элюатов к образцам калибровочной плазмы крови добавляли 2–10% раствора для элюции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессионная конструкция рOptivec/F8, кодирующая полноразмерный фактор VIII, была создана на основе вектора рOptivec-ТОРО. Стратегия клонирования делеционного варианта – SQ-мутеина с делетированным В-доменом, основана на мини-

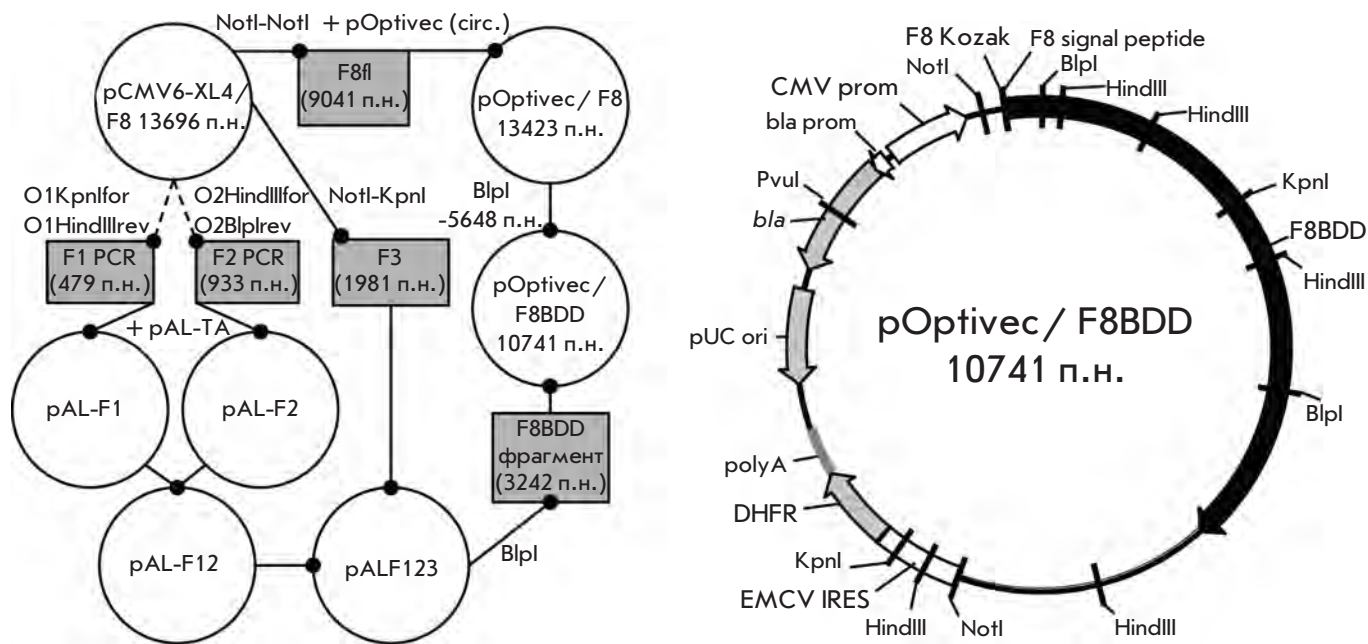


Рис. 1. Общая схема клонирования и карта экспрессионной плазмиды pOptivec/F8BDD. Линейные фрагменты ДНК изображены в виде прямоугольников, плазмиды – кругов. Стадии ПЦР (PCR) показаны пунктирной линией, стадии рестрикции-лигирования – сплошной. CMV prom – цитомегаловирусный промотор, F8 Kozak – природная последовательность Козак гена FVIII, F8 signal peptide – последовательность, кодирующая природный сигнальный пептид FVIII, F8BDD – OPC SQ-варианта фактора VIII с делетированным доменом B, EMCV IRES – внутренний участок связывания рибосома вируса энцефаломиокардита, DHFR – OPC дигидрофолатредуктазы, polyA – сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота, pUC ori – бактериальная область начала репликации, bla – OPC β-лактамазы, bla prom – промотор гена β-лактамазы. Направление транскрипции генов указано стрелками. Обозначены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, использованных при клонировании.

мальном использовании ПЦР для уменьшения вероятности возникновения мутаций. Два коротких ПЦР-продукта, F1 и F2, фланкирующих область делеции, клонировали независимо, а затем соединили с фрагментом F3, полученным рестрикцией плазмиды pCMV6-XL4/NM_000132 и соответствующим N-концевой части FVIII. Для получения экспрессионной конструкции pOptivec/F8BDD фрагмент BlnI-BlnI плазмиды pOptivec/F8, кодирующей полно-размерный белок, заменили BlnI-BlnI-фрагментом сборки F1-F2-F3 (рис. 1).

Получена экспрессионная конструкция, содержащая CMV-промотор, последовательность Козак природного гена фактора FVIII, OPC BDD-FVIII, IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), обеспечивающий 5'-кеп-независимую инициацию трансляции, OPC дигидрофолатредуктазы мыши, позволяющей проводить отбор стабильно трансфицированных клеток в селективной среде и последующую амплификацию кассеты FVIII-IRES-dhfr в геноме клеток, об-

работанных МТХ. Для получения стабильных линий использовали линейаризованные плазмиды с разрушенным иррелевантным геном β-лактамазы.

Получение линии-производителя

Дефектные по DHFR клетки CHO DG-44 трансфицировали линейаризованными экспрессионными плазмидами в бессывороточной среде с использованием реагента, свободного от продуктов животного происхождения. Эффективность трансфекции определяли при помощи контрольной плазмиды, кодирующей усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP) под контролем промотора CMV. От 10 до 20% клеток экспрессировали ген eGFP через 48 ч после начала трансфекции, при этом более 85% клеток были жизнеспособными. Проводили по три независимых трансфекции каждой плазмидой, кодирующей FVIII. Пулы стабильно трансфицированных клеток получены во всех случаях в результате культивирования трансфицированных клеток в селективной среде

Таблица 3. Секретция BDD-FVIII 10 наиболее продуктивными клональными клеточными линиями

Клональная линия, номер	18	22	17	9	1	2	15	3	4	16
Секретируемый BDD-FVIII, МЕ/л*	502	475	434	416	410	399	395	379	378	375

*Концентрацию секретируемого продукта измеряли для прикрепленных культур в момент достижения конfluenceности.

в течение 15–20 дней. Концентрацию секретируемого FVIII определяли методом ИФА. Она составила менее 10 МЕ/л в случае всех трех пулов, секретирующих полноразмерный FVIII. Обнаружен пул с уровнем секреции BDD-FVIII 71 ± 10 МЕ/л, который использовали для амплификации трансгена.

Клетки выбранного пула обрабатывали МТХ, начиная с концентрации 25 нМ. После стабилизации культуры, определенной как возрастание доли живых клеток выше 85%, концентрацию МТХ удваивали и продолжали амплификацию (рис. 2). Не обнаружено плавного подъема уровня секреции BDD-FVIII в течение всего курса амплификации, максимальный уровень BDD-FVIII в кондиционированной среде получен после пяти последовательных шагов амплификации (0.5 мкМ МТХ). Дальнейшее увеличение концентрации МТХ привело к немедленному падению уровня секреции продукта в 10 раз с последующим возвращением к величинам, примерно соответствующим исходной культуре стабильно трансфицированных клеток (74 ± 6 МЕ/л для 16 мкМ МТХ). Это явление предположительно обусловлено увеличением в популяции доли непродуцирующих клеток, содержащих измененную бицистронную мРНК [10] или амплифицированные «посторонние» гены, например ген множественной

лекарственной устойчивости, кодирующий гликопротеин Р [11].

Пул клеток с максимальным уровнем продукции BDD-FVIII, полученным в присутствии 0.5 мкМ МТХ, использовали для клонирования клеток-продуцентов методом предельного разведения. В лунках, содержащих единичные колонии, обнаружили 22 клона, секретирующих, согласно данным ИФА, целевой белок. Клональные линии подращивали в условиях адгезионного культивирования до количества 10^6 клеток, после чего определяли концентрацию секретируемого BDD-FVIII (табл. 3). Культивирование четырех клональных линий с максимальным уровнем продукции целевого белка было продолжено в условиях суспензионной культуры; концентрацию BDD-FVIII в кондиционированной среде определяли повторно после трех и 10 последовательных пассажей (10 и 30 дней непрерывного культивирования). Не зафиксировано существенного падения уровня BDD-FVIII в двух клональных линиях, № 18 и № 22, (данные не приведены), более продуктивную линию № 18 выбрали для дальнейшего использования.

Нами охарактеризован секретируемый BDD-FVIII из кондиционированной среды и клеточных лизатов отобранной клональной линии, названной DG-BDD-FVIII-18. Согласно данным иммуноблотинга (рис. 3),

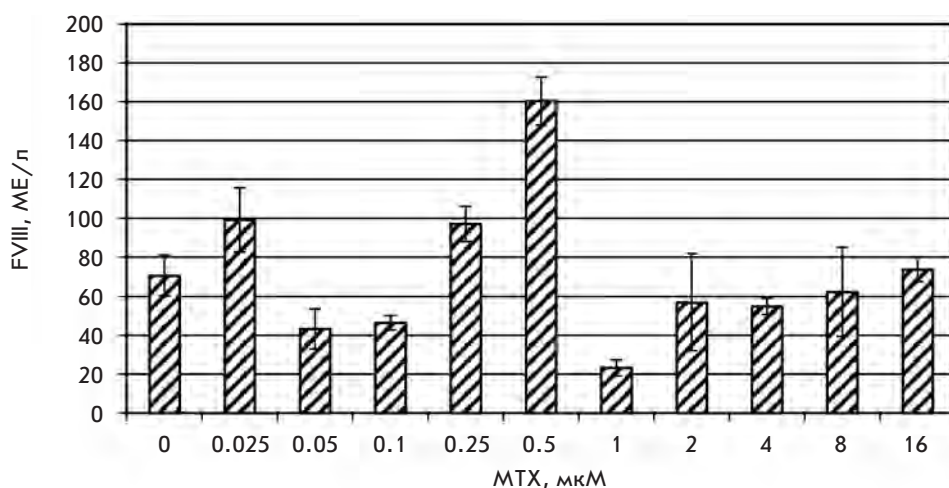


Рис. 2. Уровень секреции BDD-FVIII в конfluenceнтных клеточных популяциях по данным ИФА. Измерения проводили в двух повторностях, погрешности указаны для доверительных интервалов 95%.

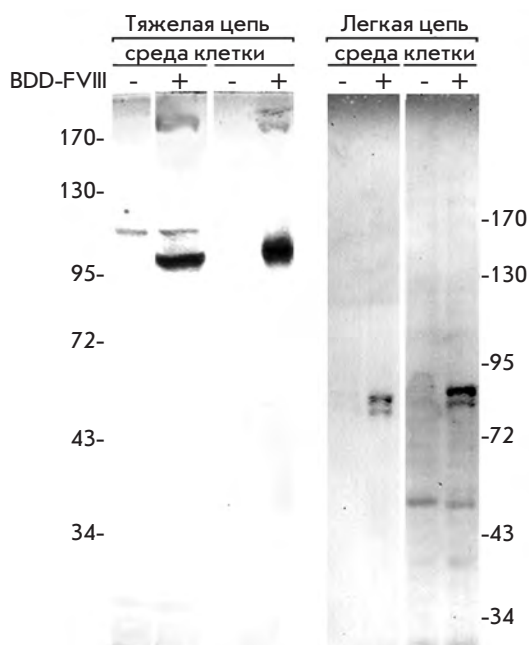


Рис. 3. Иммуноблотинг секретированного и внутриклеточного BDD-FVIII. «тяжелая цепь» и «легкая цепь» – гибридизация с моноклональными антителами к тяжелой и легкой цепи FVIII соответственно; «BDD-FVIII-» и «BDD-FVIII+» – образцы, соответствующие нетрансфицированным клеткам CHO DG-44 и клеткам линии DG-BDDFVIII-18 соответственно. Приведенные для каждого из антител дорожки соответствуют одной мембране, разделенные в 7.5% ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях, молекулярные массы указаны в кДа.

основная часть секретированного BDD-FVIII и его внутриклеточного белка-предшественника была процессирована до двухцепочечной формы. Небольшое количество одноцепочечной формы обнаруживалось только при использовании моноклонального антитела против тяжелой цепи. Продукты протеолитической деградации не выявлялись обоими антителами, что указывает на достаточно высокую протеолитиче-

скую стабильность целевого белка в использованной культуральной среде. Подвижность полос тяжелой и легкой цепи при ДСН-ПААГ соответствовала подвижности цепей BDD-FVIII, определенной ранее [12].

Прокоагулянтную активность BDD-FVIII в кондиционированной среде измеряли по способности уменьшать время свертывания субстратной плазмы крови больных гемофилией А в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Активность FVIII в проанализированной культуральной среде равна 0.47 МЕ/мл, а уровень антигена FVIII в этом образце, измеренный при помощи ИФА, составил 0.52 МЕ/мл. Таким образом FVIII, секретируемый клональной клеточной линией DG-BDD-FVIII-18, обладает полной удельной прокоагулянтной активностью.

Промышленная очистка белка BDD-FVIII включает в себя четыре стадии обычной хроматографии и одну стадию аффинной хроматографии [13]. Таким образом, ключевым компонентом всего процесса может быть мкАт, способное связывать BDD-FVIII из культуральной среды или из промежуточного концентрата и диссоциировать в мягких условиях элюции. Типичным раствором, пригодным для элюции FVIII с иммуноаффинных колонок, является раствор 50% этиленгликоля в PBS [14].

Моноклональные антитела, пригодные для аффинной очистки BDD-FVIII, получены путем скрининга гибридомных клонов (продуцирующих антитела к FVIII) при помощи ИФА. Лунки с комплексами антиген-антитело трижды промывали раствором, содержащим 50% этиленгликоля, а контрольные лунки – раствором PBS-Твин. В целевых клонах гибридом должно было наблюдаться максимальное снижение уровня сигнала при промывке раствором этиленгликоля. Из 34 клонов гибридом, полученных после одного слияния спленоцитов мыши, иммунизированной FVIII, были отобраны четыре клона с высоким титром специфических антител и максимальной чувствительностью к промывке лунок раствором этиленгликоля (табл. 4).

Таблица 4. Свойства моноклональных антител, чувствительных к этиленгликолю

Клон	Титр мкАт в асцитной жидкости	Падение сигнала в ИФА при промывке этиленгликолем, %	Динамическая емкость сорбента, МЕ/мл	Степень элюции FVIII, %
A2	1 : 123 000	40	2.6	89
E3	1 : 68 500	39	2.8	89
A4	1 : 27 500	15	1.6	>90
B6	1 : 123 000	35	3.4	86

Все четыре отобранных мкАт избирательно связывались с тяжелой цепью BDD-FVIII при иммуноблоттинге (данные не приведены), т.е. узнаваемые этими антителами эпитопы находятся вне домена В. Очищенные мкАт, полученные из асцитной жидкости, были иммобилизованы на активированном N-гидроксисукцинимидом хроматографическом сорбенте в соотношении 1 мг мкАт на 1 мл осажденного сорбента. Полученные иммуносорбенты использовали для выделения BDD-FVIII непосредственно из кондиционированной среды методом адсорбции в объеме. В таких условиях наблюдалась неполная адсорбция BDD-FVIII (около 20–30%), но практически весь адсорбированный целевой белок удерживался на сорбенте при промывке PBS и элюировался 50% раствором этиленгликоля. Уровень FVIII во фракции несвязавшихся белков и во фракциях элюатов измеряли при помощи коагулометрического теста. Присутствие активного FVIII во фракциях элюата указывало на то, что в использованных условиях элюции не происходит существенного повреждения продукта. Таким образом, получены мкАт, потенциально пригодные для препаративной иммуноаффинной очистки рекомбинантного FVIII.

ВЫВОДЫ

Цель работы состояла в создании стабильной клеточной линии, продуцирующей рекомбинантный FVIII, и в получении моноклональных антител для иммуноаффинной очистки целевого белка.

Для этого были получены экспрессионные конструкции, содержащие кДНК, кодирующие полноразмерный FVIII человека и его вариант BDD-FVIII (с делецией домена В). Правильность нуклеотидной последовательности кодирующих областей была подтверждена полным секвенированием области вставки. При получении популяций стабильно

трансфицированных клеток установлено, что уровень секреции целевого белка значительно выше при трансфекции конструкцией, кодирующей BDD-FVIII. Этот вариант стабильно трансфицированных клеток использовали для амплификации трансгена под действием метотрексата и последующего клонирования клеток-продуцентов. Создана клональная линия-продуцент DG-BDDFVIII-18, уровень секреции BDD-FVIII в которой составляет 500 МЕ/л. Целевой белок в кондиционированной среде обладал биологической активностью и был представлен преимущественно зрелой двухцепочечной формой. Линия-продуцент была получена без использования веществ животного происхождения, она поддерживается в суспензионных условиях культивирования в ростовой среде определенного химического состава. Получены также моноклональные антитела, направленные против тяжелой цепи BDD-FVIII и пригодные для иммуноаффинной очистки нативного целевого белка.

Таким образом, созданы оба основных компонента, необходимые для промышленного получения рекомбинантного FVIII – клональная линия-продуцент, не контактировавшая с веществами животного происхождения, и моноклональные антитела для аффинной очистки продукта. В дальнейшем планируется создать более продуктивные клональные клеточные линии и разработать процесс получения FVIII. ●

Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН, организованном при поддержке РФФИ.

Работа выполнена при поддержке грантов правительства Москвы № 8/3-330н-08, 8/3-332н-08, 8/3-125н-09.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Blumel J., Schmidt I., Effenberger W., Seitz H., Willkommen H., Brackmann H.H., Lower J., Eis-Hubinger A.M. // *Transfusion*. 2002. V. 42. № 11. P. 1473–1481.
- Yokozaki S., Fukuda Y., Nakano I., Katano Y., Toyoda H., Takamatsu J. // *Blood*. 1999. V. 94. № 10. P. 3617.
- Evatt B.L. // *Haemophilia*. 1998. V. 4. № 4. P. 628–633.
- Thompson A.R. // *Semin. Thromb. Hemost.* 2003. V. 29. № 1. P. 11–22.
- Pittman D.D., Alderman E.M., Tomkinson K.N., Wang J.H., Giles A.R., Kaufman R.J. // *Blood*. 1993. V. 81. № 11. P. 2925–2935.
- Lind P., Larsson K., Spira J., Sydow-Backman M., Almstedt A., Gray E., Sandberg H. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 232. № 1. P. 19–27.
- Kessler C.M., Gill J.C., White G.C., Shapiro A., Arkin S., Roth D.A., Meng X., Lusher J. M. // *Haemophilia*. 2005. V. 11. № 2. P. 84–91.
- Chun B.H., Park S.Y., Chung N., Bang W.G. // *Biotechnol. Lett.* 2003. V. 25. № 4. P. 315–319.
- Harlow E., Lanes D. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988. 726 p.
- Fann C.H., Guirgis F., Chen G., Lao M.S., Piret J.M. // *Biotechnol. Bioeng.* 2000. V. 69. № 2. P. 204–212.
- Assaraf Y.G., Molina A., Schimke R.T. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 31. P. 18326–18334.
- Kelley B.D., Booth J., Tannatt M., Wub Q.L., Ladner R., Yuc J., Potter D., Ley A. // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1038. № 1–2. P. 121–130.
- Kelley B., Jankowski M., Booth J. // *Haemophilia*. 2010. V. 16. № 5. P. 717–725.
- Griffith M. // *Ann. Hematol.* 1991. V. 63. № 3. P. 131–137.

УДК 615.918

Цитотоксические и иммунохимические свойства вискумина, инкапсулированного в полилактидные микрочастицы

Е. С. Колотова^{1*}, С. Г. Егорова¹, А. А. Рамонова¹, С. Э. Богородский², В. К. Попов², И. И. Агапов³, М. П. Кирпичников¹

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

²Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, 142190, Троицк Моск. обл., ул. Пионерская, 2

³ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Минздравсоцразвития РФ, 123182, Москва, ул. Щукинская, 1

*E-mail: ekaterinakolotova@mail.ru

Поступила в редакцию 28.09.2011 г.

РЕФЕРАТ Методом сверхкритической флюидной инкапсуляции с использованием ультразвука получены биорезорбируемые полилактидные микрочастицы с инкапсулированным белковым цитотоксином вискумином. По данным электронной микроскопии, размер частиц составил от 10 до 50 мкм. Кинетика высвобождения вискумина из микрочастиц была изучена в иммуноферментной тест-системе с использованием анти-вискуминовых моноклональных антител. Показано, что в полимерные микрочастицы включается 99.91% добавленного в реакционную смесь цитотоксина. В течение 120 ч инкубации микрочастиц в фосфатно-солевом буфере с нейтральным значением pH высвободилось 0.08% от первоначально инкапсулированного белка. Анализ цитотоксической активности и иммунохимических свойств инкапсулированного вискумина показал, что метод «сухой» сверхкритической флюидной инкапсуляции с использованием ультразвука не влияет на биологические свойства вискумина и может использоваться для получения биodeградируемых полилактидных микрочастиц-носителей с включенными в них биологически активными веществами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биodeградируемые микрочастицы, вискумин, полилактид.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СКФ – сверхкритический флюидный; ск-СО₂ – сверхкритическая двуокись углерода; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; ТМБ – тетраметилбензидин; МСГ – магнитно-стрикционный генератор; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; БСА – бычий сывороточный альбумин; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазолил-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид; ЛД₅₀ – доза токсина, вызывающая гибель 50% клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Вискумин – рибосом-инактивирующий лектин, содержится в экстрактах листьев растения омела белая. Вискумин состоит из двух субъединиц А и В, связанных дисульфидной связью и имеет молекулярную массу 60 кДа [1, 2]. Вискумин активно используется в противоопухолевой терапии и находит в этой области все более широкое применение [3–6]. Эффективность действия вискумина можно увеличить, если заключить его в биорезорбируемые полимерные микрочастицы, что обеспечит его химическую и пространственную стабилизацию, а также пролонгированный выход в окружающие ткани организма и, как следствие, более длительное воздействие токсина на опухолевые клетки.

Полилактиды представляют собой класс биорезорбируемых полимеров, относящихся к гомологическому ряду алифатических полиэфиров, которые находят все более широкое применение в биомедицине и фармацевтике [7]. Полилактид – это полимер молочной кислоты, которая, имея асимметрично расположенные атомы углерода (рис. 1), легко образует оптически активные циклические димеры (лактиды), полимеризующиеся, как и гликолиды, в результате каталитического раскрытия 1,4-диоксановых колец.

Полилактид является более гидрофобным соединением по сравнению с полигликолидом, поскольку содержит метильные группы. Он легче растворяется и в органических растворителях. Поскольку мономер молочной кислоты существует

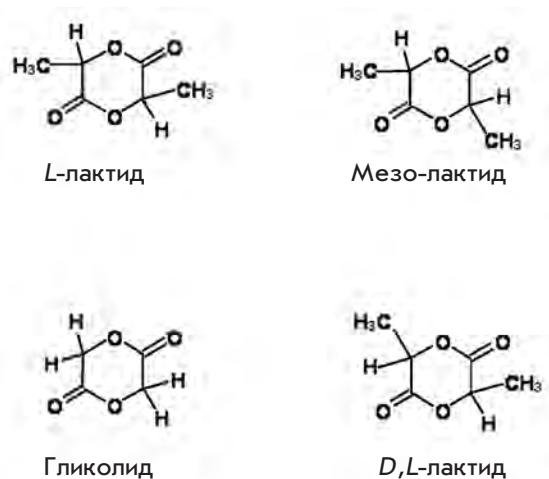


Рис. 1. Циклические димеры для синтеза алифатических полиэфиров.

в двух стереохимических формах, возможен синтез четырех морфологически различных полилактидов: двух стереорегулярных полимеров – поли(*D*-лактида) и поли(*L*-лактида); полимеризованной смеси *D*- и *L*-молочных кислот – поли(*D,L*-лактида); поли(мезо-лактида) – смеси *D*- и *L*-лактидов. Полимеры, синтезированные только из оптически активной *D*- или *L*-молочной кислоты, являются поликристаллическими, в то время как оптически неактивные поли(*D,L*-лактиды) – аморфные. Это обстоятельство весьма важно для практического использования, поскольку скорость гидролиза данных соединений (определяющая кинетику их биорезорбции в живом организме) обратно пропорциональна степени их кристалличности. Гликолид – более простое соединение, которое существует только в одной форме. Идентичность каталитической реакции раскрытия колец гликолидов и лактидов позволяет проводить их сополимеризацию с образованием высокомолекулярных сополимеров – полилактогликолидов, существенно расширяя круг биорезорбируемых синтетических материалов с различными биохимическими и механическими свойствами.

Способность алифатических полиэфиров к постепенному биологическому разложению в организме используется как для временной защиты активных молекул или лекарственных средств от быстрого расщепления различными ферментами и пептидами, так и для их адресной доставки в определенные клетки, ткани и органы, а также для контроля скорости высвобождения этих молекул из полимерной матрицы, обеспечивая более длительное терапевтическое воздействие [7]. С этой целью лекарственное

средство инкапсулируют в полимерный носитель и вводят в организм с помощью инъекций или перорально [8, 9]. Метод «сухой» сверхкритической флюидной (СКФ) инкапсуляции может успешно использоваться для включения различных биологически активных веществ (ферментов, пептидов, белков и лекарственных средств) в полимерные микрочастицы практически без потери их физико-химических и биологических свойств [10–12]. Это отличает СКФ-инкапсуляцию от других методов, применение которых подразумевает использование высоких температур (до 100°C и выше) и токсичных органических растворителей, которые достаточно трудно удалить из готового продукта [10]. Сверхкритическая двуокись углерода (ск-СО₂) позволяет проводить инкапсуляцию биоактивных компонентов в различные типы аморфных полимеров без использования жидких растворителей при температуре, близкой к комнатной, и умеренном давлении (критические параметры для СО₂ – $T_{кр} = 31^\circ\text{C}$, $P_{кр} = 7.4$ МПа). Ск-СО₂ легко и практически без остатка удаляется из полимера простым сбросом давления ниже критического значения [13].

Ранее [11] нами были проведены первые модельные эксперименты по СКФ-инкапсуляции вискумина в полилактидные микроматрицы. Как оказалось, время выхода вискумина можно регулировать при помощи изменений условий СКФ-инкапсуляции, что, в принципе, позволяет создавать препараты пролонгированного действия с определенной кинетикой высвобождения активного вещества из полимерного носителя.

В представленной работе изучены иммунохимические и цитотоксические свойства вискумина после его высвобождения из микрочастиц, полученных тем же методом, но с использованием ультразвука. Ультразвук позволил получить более плотные частицы мелкого размера (10–50 мкм).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вискумин был любезно предоставлен проф. У. Пфюллером (Институт фитохимии, Университет Виттен-Хердеке, Германия). В качестве исходного биорезорбируемого полимера использовали *D,L*-полилактид PURASORB PDL 02 (производство «PURAC Biochem bv», Нидерланды) с молекулярной массой $M_w \sim 20000$. Диоксид углерода марки «ос. ч.» (99.99%) производства Балашихинского кислородного завода (Московская обл., Россия) использовали без дополнительной очистки. Использовали также сухой фосфатно-солевой буфер (ФСБ, «Flow Laboratories», Великобритания), двухкомпонентный комплект реагентов для субстратной смеси на основе тетраметилбензидина для иммуноферментного анализа (ТМБ)

и конъюгат стрептавидин-пероксидаза («Имтек», Россия); полистироловые плашки («Costar», США). Моноклональные антитела MNA4 и MNA9-биотин против разных эпитопов А-субъединицы вискумина были получены нами ранее [14, 15]. Все остальные реактивы производства «Sigma-Aldrich Corp.» (США).

Инкапсуляция вискумина в полилактидные микрочастицы

Инкапсуляцию вискумина в полилактидный носитель проводили на экспериментальной установке, подробно описанной в [16]. Ее основное отличие от оборудования, примененного ранее [11], состояло в использовании мощного (до 1 кВт) ультразвукового (18 ± 0.2 кГц) воздействия на систему полимер/вискумин, находящуюся непосредственно в атмосфере CO_2 . Конструктивно этот подход реализовали с помощью магнитно-стрикционного генератора (МСГ) с акустическим концентратором и титановым индуктором, введенным в реакционную камеру высокого давления.

Процесс формирования биоактивных микрочастиц проходил в следующей последовательности. В реакционную камеру высокого давления загружалось 0.1 г порошкообразного полилактида (характерный размер частиц 100–200 мкм), полученного из предварительно механически измельченных исходных полимерных гранул (диаметром $\sim 3 \div 4$ мм), и 1 мг порошка лиофилизированного вискумина. Камеру уплотняли и в нее подавали CO_2 комнатной температуры до достижения давления 5 МПа. После этого включались нагреватели камеры и сопла. Температура камеры, как правило, составляла 40°C, а температура сопла изменялась от 40 до 80°C. По мере разогрева камеры давление в ней увеличивалось. При достижении требуемой температуры давление в камере доводили до заранее выбранной величины – $10 \div 20$ МПа. Затем включался блок питания и управления МСГ, мощность которого изменялась в пределах от 0.1 до 1.0 кВт. Для формирования установившегося режима СКФ-пластификации полимерной смеси с вискумином в реакторе систему выдерживали при этих условиях примерно 30 мин. После этого с помощью импульсного клапана через сопло диаметром 0.5 мм производился импульсный сброс пластифицированной смеси и диоксида углерода в приемную камеру.

После выдерживания полученного продукта в приемной камере в атмосферных условиях в течение 3 ч (необходимого для полного удаления CO_2 из частиц полимера и их окончательного затвердевания), собранные микрочастицы помещали в стеклянные пробирки объемом 1.5 мл и хранили при температуре +4°C до их дальнейшего анализа.

Сканирующая электронная микроскопия

Морфологию поверхности полимерных микрочастиц с вискумином, инкапсулированным с помощью CO_2 , изучали с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе LEO 1450 («Carl Zeiss», Германия). Для этого небольшое количество исследуемого порошка наносили на проводящую (углеродную) клейкую ленту, на которую затем методом плазменного напыления наносили тонкую (~ 0.05 – 0.1 мкм) пленку золота, обеспечивающую требуемую электропроводность.

Исследование кинетики выхода вискумина из полилактидных микрочастиц

Сухой порошок полилактидных микрочастиц (16.5 мг), содержащих вискумин, суспендировали в 2 мл ФСБ, суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 12100 g и отбирали супернатант. Оставшиеся частицы полилактида снова суспендировали в 2 мл ФСБ и перемешивали на качалке при 22°C. Супернатант отбирали и вносили очередную порцию ФСБ через 10, 30, 60, 120, 360, 1440, 2880 и 7200 мин соответственно. Полученные образцы хранили при +4°C.

Анализ количества вискумина, высвободившегося при деградации полилактидных микрочастиц

Количество вискумина в образцах (т.е. в супернатанте, отобранном в разные временные точки) определяли с использованием модифицированной тест-системы, описанной ранее [14, 15]. На 96-луночный планшет сорбировали моноклональные антитела MNA4 против вискумина в концентрации 10 мкг/мл в ФСБ по 100 мкл на лунку. Инкубировали в течение 24 ч при +4°C. Три раза отмывали раствором, содержащим 20 ммоль/л лактозы и 0.05% Твин-20 в ФСБ. Чтобы блокировать свободные сайты связывания полистироловой поверхности, в каждую лунку вносили по 100 мкл буфера, содержащего 0.1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 20 ммоль/л лактозы и 0.05% Твин-20 в ФСБ. Инкубировали в течение 1 ч при 37°C, вновь отмывали 3 раза и вносили по 100 мкл исследуемых образцов, содержащих вискумин в разных разведениях. В качестве контроля использовали вискумин в различных концентрациях. Инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Наносили меченные биотином моноклональные антитела MNA9 против вискумина в концентрации 2 мкг/мл. Инкубировали в течение 1 ч при 37°C, отмывали 3 раза, после чего инкубировали (1 ч, 37°C) с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза и отмывали 5 раз. Проявляли с помощью субстратного буфера ТМБ в течение 20 мин при 37°C. Реакцию останавливали 10% серной кислотой по 50 мкл на лунку. Колориметрические изме-

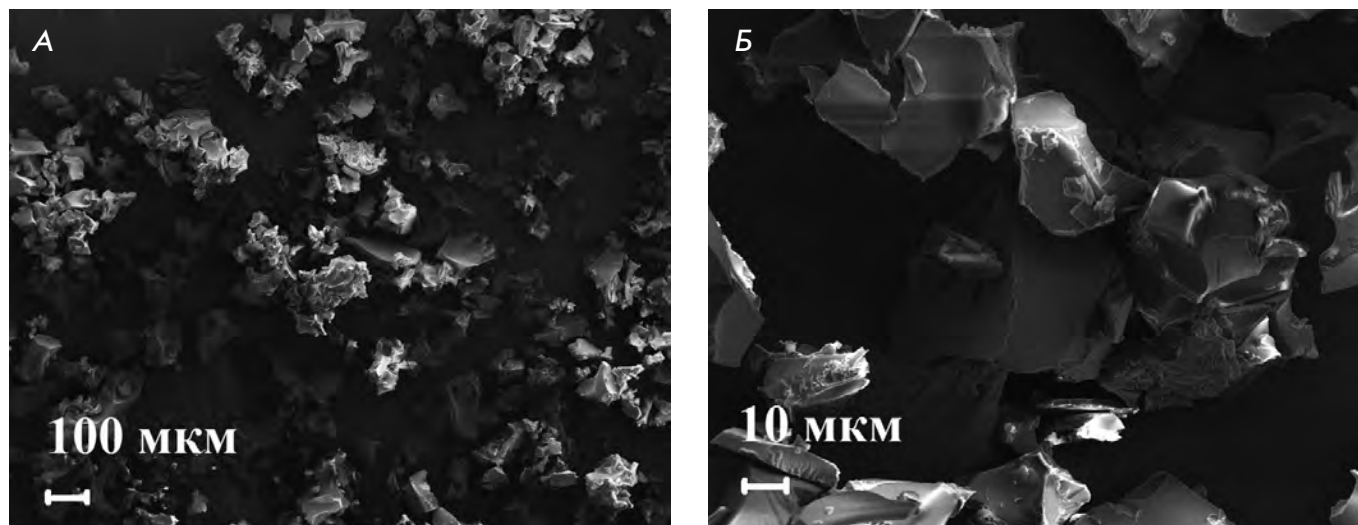


Рис. 2. Электронные микрофотографии полилактидных микрочастиц, содержащих вискумин. А – общий вид, Б – детальная структура.

рения проводили при 450 нм на спектрофотометре Multiskan® PLUS-314.

Количество вискумина, включившегося в микро-частицы, определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа по схеме, описанной выше. Для этого был проведен полный гидролиз образца полилактидных микрочастиц при 42°C в течение 48 ч (5 мг образца в 10 мл ФСБ).

Оценка цитотоксических свойств вискумина после его выхода из полилактидных микрочастиц

Цитотоксическую активность вискумина, высвободившегося из биополимерных микрочастиц, определяли с помощью МТТ-теста по методике, описанной ранее [17, 18]. Для оценки выживаемости клеток определяли дозу токсина (вискумина), вызывающую гибель 50% клеток (LD_{50}). В качестве контроля использовали вискумин, не подвергавшийся инкапсуляции. При расчете LD_{50} за 100% принимали интенсивность окрашивания клеток, культивируемых в отсутствие цитотоксического агента. Приведены данные одного из трех типичных опытов в виде $LD_{50} \pm$ стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлены характерные СЭМ-микрофотографии экспериментальных образцов после их выемки из приемной камеры СКФ-установки. Видно, что образцы состоят как из индивидуальных микрочастиц размером от 10 до 50 мкм, так и из их агломератов (до 200 мкм). При этом сами полилактидные микрочастицы представляют собой плотные

объемные частицы неправильной формы с довольно гладкой поверхностью.

Использование мощного ультразвукового воздействия дало возможность не только добиться более однородного перемешивания исходных компонентов (вискумина и полилактида), но также существенно снизить вязкость пластифицированного в ск-СО₂ полимера за счет введения дополнительной акустической энергии в систему. Совокупность этих факторов привела к кардинальному изменению режима последующего диспергирования полученной смеси в приемную камеру атмосферного давления, что, в свою очередь, резко изменило морфологию образующихся биоактивных полимерных структур.

Так в [11], при использовании в аналогичных условиях только магнитного смесителя происходило формирование полилактидных волокнистых матриц, состоящих из пористых микрочастиц неправильной формы размером от 50 до 200 мкм. В то же время применение интенсивного акустического воздействия привело к образованию плотных индивидуальных микрочастиц с характерным размером от 10 до 50 мкм.

Для определения количества вискумина в образцах использовали тест-систему на основе моноклональных антител MNA4 и MNA9-биотин против вискумина, описанную ранее [14, 15]. Эта система позволяет специфически определять вискумин и имеет предел чувствительности около 0.8 нг/мл. С помощью данной тест-системы мы оценили общее количество вискумина в образце полилактидных частиц весом 5 мг. Эта величина оказалась равной 50 мкг, что со-

ставляет 1 вес.% и равно количеству вискумина, подвергнутому инкапсуляции. Это может указывать на сохранность антигенной структуры белка после инкапсуляции.

Логично предположить, что на поверхности микро-частиц мог остаться и неинкапсулированный вискумин. Для удаления несвязавшегося вискумина дважды производили отмывку 16.5 мг микро-частиц в ФСБ (временные точки 0 и 10 мин). Количество вискумина в данных пробах составило 0.145 мкг, т.е. 0.09% от количества токсина, подвергнутого инкапсуляции. Таким образом, количество инкапсулированного вискумина составило 99.91%. Количество вискумина, вышедшего из полилактидных микро-частиц, в интервале от 0 до 120 ч отражено на рис. 3А и 3Б.

Из рис. 3Б видно, что с увеличением времени инкубации количество токсина в супернатантах уменьшается. Это говорит о медленной деградации полимерных микро-частиц с постепенным высвобождением вискумина. Увеличение количества вискумина в супернатантах в точках 360 и 1440 мин можно объяснить более длительной инкубацией, в течение которой большее количество токсина выходит из распавшегося полимера. Кроме того, начиная с 2880 мин выход вискумина происходит более медленно. Вероятно, такая кинетика выхода токсина связана со структурой полилактидных микро-частиц, т.е. внутри микро-частицы, возможно, плотнее, чем снаружи. Суммарно (за вычетом количества вискумина, обнаруженного в пробах после первых двух отмывок) за 120 ч из полилактидной матрицы высвободилось 0.134 мкг вискумина, что составило 0.08% от первоначально инкапсулированного.

Вискумин – представитель группы инактивирующих рибосомы белков 2-го типа, он может использоваться для удаления эукариотических клеток-мишеней [19–21]. При помощи МТТ-теста показано, что вискумин сохраняет цитотоксическую активность после выхода из полилактидных микро-частиц. Цитотоксическая активность вискумина в супернатантах остается практически такой же, как у токсина, который не подвергался обработке: концентрация нативного вискумина, приводящая к гибели 50% клеток линии 3Т3 (LD_{50}), через 48 ч составляет $7 \times 10^{-12} \pm 3 \times 10^{-12}$ М, при этом LD_{50} вискумина в анализируемых образцах составила $7 \times 10^{-12} \pm 2 \times 10^{-12}$ М.

Важно отметить, что, изменяя режимы СКФ-инкапсуляции и распыления пластифицированной полимерной смеси, можно в достаточно широких пределах варьировать морфологию поверхности и внутренней структуры формируемых полимерных микро-частиц (от высокопористых до практически монолитных), что определяющим образом будет сказываться на кинетике высвобождения из них био-

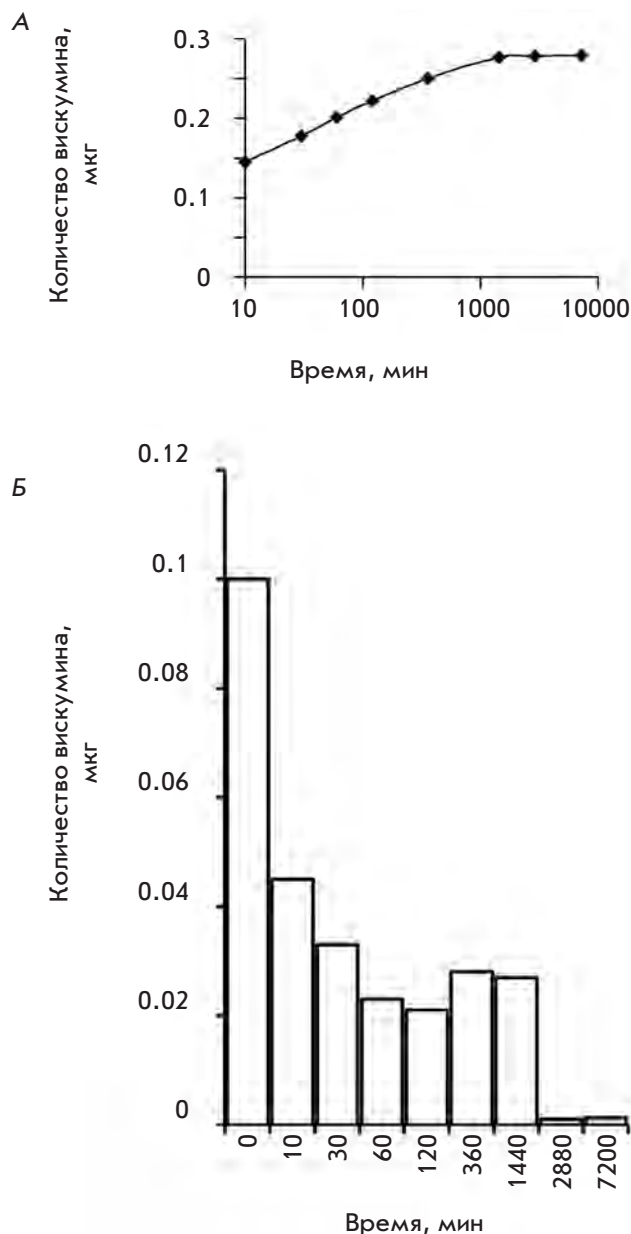


Рис. 3. Кинетика выхода вискумина из полилактидных микро-частиц. А – суммарное количество вискумина в супернатантах. Б – количество вискумина, выделенное из микро-частиц, в зависимости от времени инкубации.

активных компонентов. Полученные нами результаты наглядно демонстрируют этот факт. Так, в работе [11], полилактидные структуры, содержащие вискумин, представляли собой агломераты пористых частиц (характерный коэффициент пористости 20–25%) неправильной формы, в отличие от плотных микро-частиц с гладкой поверхностью, полученных

в настоящей работе (рис. 2А и 2Б). Соответственно и кинетика его выхода из этих структур в аналогичных условиях (супендирование в ФСБ, медленное перемешивание на качалке при 22°C, отбор проб после двух отмывок, а также через 30, 60, 120, 360, 1440, 2880 и 7220 мин) кардинально отличалась от приведенной на рис. 3А.

Вискумин может быть использован в противоопухолевой терапии [22]. Использование биосовместимых, биодegradуемых систем с медленным высвобождением вискумина достаточно перспективно. Снижение размера биодegradуемых микрочастиц с вискумином и/или с другим специфическим противоопухолевым цитотоксином позволяет использовать менее травматичное введение препарата посредством инъекций в область роста опухоли.

Метод «сухой» сверхкритической флюидной инкапсуляции с использованием ультразвука не влия-

ет на цитотоксические и иммунохимические свойства вискумина, заключенного в полилактидные микрочастицы. Разработанный метод инкапсуляции обеспечивает постепенный выход инкапсулированного токсина из микрочастиц, что может обеспечивать более длительное терапевтическое воздействие. ●

Работа осуществлялась при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» по Государственному контракту № П 407 от 12.05.2010 и № 14.740.11.0461 01.10.2010, а также на средства Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 09-02-00173 и 11-02-12185).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barbieri L., Battelli M.G., Stirpe F. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1154. P. 237–282.
2. Niwa H., Tonevitsky A.G., Agapov I.I., Saward S., Pfuller U., Palmer R.A. // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. P. 2739–2749.
3. Park R., Kim M.S., So H.S., Jung B.H., Moon S.R., Chung S.Y., Ko C.B., Kim B.R., Chung H.T. // *Biochem. Pharmacol.* 2000. V. 60. P. 1685–1691.
4. Grossarth-Maticek R., Ziegler R. // *Arzneimittelforschung.* 2007. V. 57. P. 665–678.
5. Moisenovich M., Tonevitsky A., Maljuchenko N., Kozlovskaya N., Agapov I., Volkmandt W., Bereiter-Hahn J. // *Histochem. Cell Biol.* 2004. V. 121. № 6. P. 429–439.
6. Moisenovich M., Tonevitsky A., Agapov I., Niwa H., Seme H., Bereiter-Hahn J. // *Eur. J. Cell Biol.* 2002. V. 81. P. 529–538.
7. Биосовместимые материалы / Ред. Севастьянов В.И., Кирпичников М.П. М.: МИА, 2011. 537 с.
8. Kumar P.S., Saini T.R., Chandrasekar D., Yellepeddi V.K., Ramakrishna S., Diwan P.V. // *Drug Deliv.* 2007. V. 14. P. 517–523.
9. Graves R.A., Poole D., Moiseyev R., Bostanian L.A., Mandal T.K. // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2008. V. 34. P. 419–426.
10. Howdle S.M., Watson M.S., Whitaker M.J., Popov V.K., Davies M.C., Mandel F.S., Wang J.D., Shakesheff K.M. // *Chem. Commun.* 2001. P. 109–110.
11. Хапчаев Ш.Ю., Агапов И.И., Мойсенович М.М., Рамонова А.А., Богородский С.Э., Мусаэлян И.С., Попов В.К. // *Биотехнология.* 2008. Т. 5. С. 43–49.
12. Антонов Е.Н., Богородский С.Э., Фельдман Б.М., Марквичева Е.А., Румш Л.Д., Попов В.К. // *Сверхкритические флюиды: теория и практика.* 2008. Т. 3. С. 34–42.
13. Гумеров Ф.М., Сабирзянов А.Н., Гумерова Г.И. *Суб- и сверхкритические флюиды в процессах переработки полимеров.* Казань: ФЭН, 2000. 320 с.
14. Tonevitsky A.G., Agapov I., Temiakov D., Moisenovich M., Maluchenko N., Solopova O., Würzner G., Pfueller U. // *Arzneimittelforschung.* 1999. V. 49. P. 970–975.
15. Темяков Д.Е., Агапов И.И., Мойсенович М.М. // *Молекуляр. биология.* 1997. Т. 31. С. 536–541.
16. Баграташвили В.Н., Богородский С.Э., Коновалов А.Н., Кубышкин А.П., Новицкий А.А., Попов В.К., Уптон К., Хоудл С.М. // *Сверхкритические флюиды: теория и практика.* 2007. Т. 2. № 1. С. 53–60.
17. Mosmann T. // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 65. P. 55–63.
18. Agapov I.I., Tonevitsky A.G., Maluchenko N.V., Moisenovich M.M., Bulah Y.S., Kirpichnikov M.P. // *FEBS Lett.* 1999. V. 464. P. 63–66.
19. Knopf-Sidler F., Viviani A., Rist L., Hensel A. // *Pharmazie.* 2005. V. 60. P. 448–454.
20. Urech K., Buessing A., Thalman G., Schaefermeyer H., Heusser P. // *Anticancer Res.* 2006. V. 26. P. 3049–3055.
21. Zuzak T.J., Rist L., Eggenschwiler J., Grotzer M.A., Viviani A. // *Anticancer Res.* 2006. V. 26. P. 3485–3492.
22. Schoffski P., Breidenbach I., Krauter J., Bolte O., Stadler M., Ganser A., Wilhelm-Ogunbiyi K., Lentzen H. // *Eur. J. Cancer.* 2005. V. 41. P. 1431–1438.

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 (АТФ, АМР и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (Т34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Очередность публикации устанавливается по дате принятия статьи к печати. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой редакции. Рукопись направляется на отзыв 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.