

Письмо редакторов

Уважаемые читатели!

Вашему вниманию предлагается восьмой номер «Acta Naturae» – первый в 2011 году. Как видно, несмотря на многочисленные скептические оценки в начале нашей деятельности, журнал продолжает существовать и, более того, завоевывать место под солнцем в России и за рубежом. Исключительно важна на данном этапе поддержка Минобрнауки, которая будет оказываться журналу в ближайшее время.

Как всегда, восьмой номер открывают обзорные статьи, посвященные основным проблемам наук о живом. В обзоре Е.С. Северина и М.В. Савватеевой рассматриваются проблемы функционирования мембранных рецепторных систем, ключевых для взаимодействия клетки с окружающей средой. Создание лекарств нового поколения самым тесным образом связано с исследованием этих систем. Обзор Т.А. Здобновой и соавт. затрагивает весьма актуальную проблему диагностики опухолей с помощью квантовых точек. В этой области достигнуты несомненные успехи, но остается также нерешенным целый ряд проблем, тормозящих успешное применение данного метода. В обзоре Д.А. Скворцова и др. приводятся данные по определению активности теломеразы, во многих случаях важнейшего критерия злокачественной трансформации клеток. Экспериментальные статьи освещают различные разделы биологии. Диапазон статей весьма

широк – здесь и медицинская генетика, и клеточная биология, и молекулярная физиология, и физикохимия белка. Однако подавляющую часть этих публикаций объединяет связь с медициной. По нашему мнению, тенденция к «медицинизации» отражает мировое развитие нашей науки.

В разделе «Форум» продолжена тема обсуждения актуальных вопросов как научного, так и научно-организационного плана. В сообщении Е.Б. Прохорчука рассмотрены итоги 4-й ежегодной конференции участников консорциума ICGC по изучению генома раковых клеток, состоявшегося в Австралии в декабре 2010 года. Работа в этом направлении активно развивается и остается только сожалеть, что Россия не является полноправным участником консорциума. О «вечной» проблеме российской науки – своевременного и рационального обновления научного оборудования размышляет проректор МГУ академик А.Р. Хохлов. Наконец публикация И. Стерлигова о месте и роли библиометрии, которая, по нашему мнению, объективно и взвешенно оценивает настоящее состояние вещей, весьма и весьма интересна для читателей.

Пользуясь случаем, еще раз приглашаем заинтересованных авторов направлять свои работы в наш журнал. ●

Успехов всем в наступившем 2011 году!
Редакционная коллегия

Наука и технологии России – STRF.ru



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

Откройте миру свои открытия

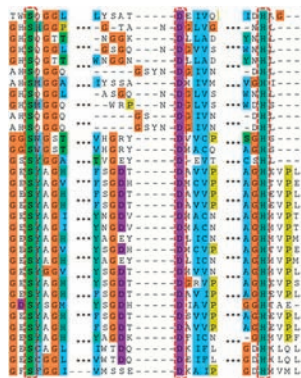
К. Д. Надеждин, О. В. Бочарова, Э. В. Бочаров, А. С. Арсеньев

Пространственная структура и динамика трансмембранного домена белка-предшественника β -амилоида

Для адекватной терапии болезни Альцгеймера необходимо понимать молекулярные основы патогенеза этого заболевания. Амилоидный β -пептид, формирующий амилоидные бляшки в головном мозге при болезни Альцгеймера, образуется в результате последовательного расщепления мембранного белка-предшественника β -амилоида (APP). В настоящей работе методами ЯМР-спектроскопии в среде, имитирующей мембранное окружение, определены пространственная структура и динамика рекомбинантного пептида, соответствующего фрагменту APP Gln686–Lys726, который включает трансмембранный домен APP с прилегающим N-концевым примембранным участком.



Схематичное изображение мицеллы ДФХ со встроенным мономером APPjmtm.



Текстовое отображение пространственного выравнивания структур активных центров ферментов семейства α, β -гидролаз.

Д. А. Суплатов, В. К. Аржаник, В. К. Швядас

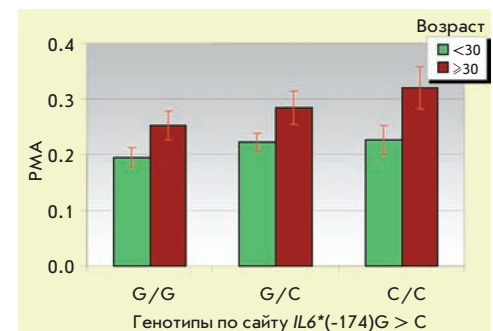
Сравнительный биоинформатический анализ структур активных центров эволюционно удаленных гомологов суперсемейства ферментов α, β -гидролаз

Сравнительный биоинформатический анализ ферментов является важным шагом в изучении взаимосвязи их структуры и функции. Предложен подход для сравнения ряда ферментов суперсемейства α, β -гидролаз, который позволил показать консервативность значительной части структуры активных центров, в том числе организации оксианионных центров, а также остатков каталитической триады даже у удаленных гомологов. Разработанный алгоритм может использоваться при сравнении структурной организации каталитических участков и участков связывания субстратов в ферментах различных классов, а также при изучении эволюции ферментов и создании банка данных структур активных центров.

А. В. Сафонова, А. Н. Петрин, С. Д. Арутюнов, В. Н. Царев, Л. В. Акуленко, О. А. Зорина, Д. В. Ребриков, А. В. Рубанович, С. А. Боринская, Н. К. Янковский

Ассоциация аллелей генов цитокинов со степенью тяжести воспалительных заболеваний пародонта у человека

Гингивит и пародонтит – воспалительные заболевания тканей пародонта, на возникновение и течение которых влияют как средовые, так и наследственные факторы. Гены цитокинов, регулирующих иммунный ответ, могут быть важным звеном, опосредующим развитие этих заболеваний. В представленной работе проведен анализ ассоциации аллелей восьми генов цитокинов с различными клиническими проявлениями заболеваний пародонта в этнически гомогенной группе (296 молодых русских мужчин). Выявлены ассоциация минорных аллелей генов IL1B и IL6 с гингивитом, а также ассоциация индекса гигиены полости рта OHI-S с аллелями гена IL18.



Средние значения (\pm SE) индекса РМА у носителей различных генотипов по гену IL6(-174) в двух возрастных группах (младше 30 лет, 215 человек; 30 и более лет, 70 человек).

Acta Naturae

ТОМ 3, № 1 (8), ЯНВАРЬ–МАРТ 2011

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. Швьядас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Е.А. Новосёлова

Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева

Директор по стратегическому развитию:

Е.Л. Пустовалова

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

Верстка: К.К. Опарин

Корректура: Р.С. Шаймарданова

Дизайн-проект: Х. Шнайдер

Адрес редакции: 119991, Москва, Ленинские горы,

Научный парк МГУ, здание 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, 2011

Номер подписан в печать 15 марта 2011 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

94 шага до успеха 6

БиоБиблиометрия 11

Раковый геном: что нового 18

ОБЗОРЫ

Е. С. Северин, М. В. Савватеева

Молекулярно-физиологические механизмы функционирования мембранных рецепторных систем 20

Т. А. Здобнова, Е. Н. Лебеденко, С. М. Деев

Квантовые точки для молекулярной диагностики опухолей 30

Д. А. Скворцов, М. Э. Зверева, О. В. Шпанченко, О. А. Донцова

Теломераза: методы определения активности 51

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

К. Д. Надеждин, О. В. Бочарова, Э. В. Бочаров,
А. С. Арсеньев

**Пространственная структура
и динамика трансмембранного домена
белка-предшественника β -амилоида 74**

А. И. Тухватулин, Д. Ю. Логунов, И. И. Гитлин,
М. М. Шмаров, П. В. Кудан, А. А. Аджиева,
А. Ф. Мороз, Н. Н. Костюкова, Л. Г. Бурделя,
Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург, А. В. Гудков

**Изучение способности лигандов
рецептора NOD1 активировать
транскрипционный фактор NF- κ B
в условиях *in vitro* и *in vivo* 82**

О. Ю. Макарычева, Е. Ю. Царева,
М. А. Судомоина, О. Г. Кулакова, Б. В. Титов,
О. В. Быкова, Н. В. Гольцова, Л. М. Кузенкова,
А. Н. Бойко, О. О. Фаворова

**Семейный анализ сцепления и ассоциации
полиморфизма генов *DRB1*, *CTLA4*,
TGFB1, *IL4*, *CCR5*, *RANTES*, *MMP9* и *TIMP1*
с рассеянным склерозом. 91**

Д. А. Суплатов, В. К. Аржаник, В. К. Швядас
**Сравнительный биоинформатический
анализ структур активных центров
эволюционно удаленных
гомологов суперсемейства
ферментов α , β -гидролаз 99**

Е. А. Смирнова, А. А. Гусев, О. Н. Зайцева,
Е. М. Лазарева, Г. Е. Онищенко, Е. В. Кузнецова,
А. Г. Ткачев, А. В. Феофанов, М. П. Кирпичников

**Углеродные нанотрубки проникают
в ткани и клетки и оказывают
стимулирующее воздействие
на проростки эспарцета
Onobrychis arenaria (Kit.) Ser. 106**

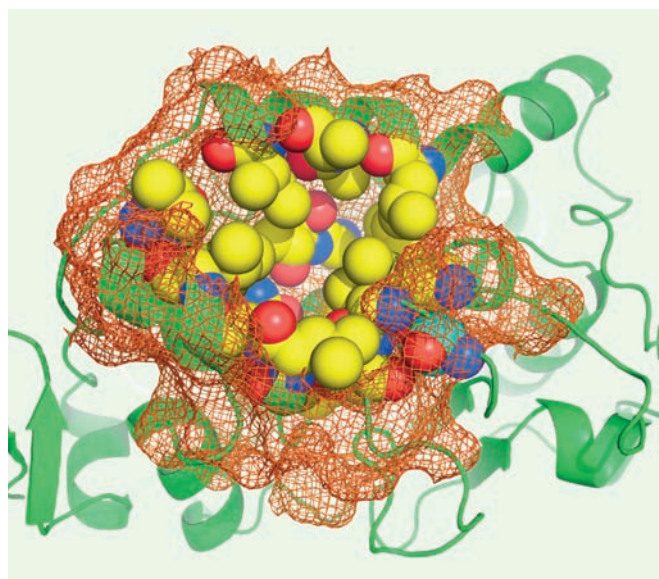
А. А. Овсепян, Д. Н. Панченков, Е. Б. Прохорчук,
Г. Б. Телегин, Н. А. Жигалова, Е. П. Голубев,
Т. Е. Свиридова, С. Т. Мацкеплишвили, К. Г. Скрыбин,
Ю. И. Бузиашвили

**Моделирование инфаркта миокарда
на мышцах: методология, мониторинг,
патоморфология 114**

А. В. Сафонова, А. Н. Петрин, С. Д. Арутюнов,
В. Н. Царев, Л. В. Акуленко, О. А. Зорина,
Д. В. Ребриков, А. В. Рубанович, С. А. Боринская,
Н. К. Янковский

**Ассоциация аллелей генов цитокинов
со степенью тяжести воспалительных
заболеваний пародонта у человека. 123**

Правила для авторов 2011 130

**РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ**

Область активного центра – фрагмент полноразмерной структуры фермента, состоящий из аминокислотных остатков, взаимодействующих с функциональными группами субстрата (показаны желтым) и обеспечивающих функционирование каталитического механизма (показаны синим), и ряда окрестных остатков, формирующих целостность выделенного фрагмента (показано сеткой). (См. статью Суплатова и др.)

94 шага до успеха

Добиться результатов в современной науке без специального оборудования невозможно. К сожалению, в нашей стране ситуация с научным оборудованием оставляет желать лучшего. Это касается не только качества приборной базы наших НИИ и университетов, но и того, как осуществляется процесс закупки научного оборудования. Об этой «вечной» проблеме российского сектора исследований и разработок читайте в интервью проректора Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова академика Алексея Хохлова, руководителя проекта «Наука и технологии РФ» Константину Киселеву.



Академик Алексей Хохлов

Константин КИСЕЛЕВ:
– Алексей Ремович, насколько проблема качества научного оборудования, правильности и своевременности его закупок действительно является для нашей науки «вечной»?

Алексей ХОХЛОВ:

– Я не думаю, что это «вечная» проблема. Конечно, во времена СССР существовали соответствующие запреты и ограничения на импорт всего, что было связано с высокими технологиями. Поэтому мы были вынуждены где-то разрабатывать сами, а где-то копировать лучшие образцы западной научной техники. Было определенное недооснащение, но какого-то катастрофического отставания не было. Более того, по ряду направлений, таких, как ядерная физика, физика низких температур, квантовая механика, нелинейная оптика, материаловедение, наше оборудование было уникальным и исключительно передовым. Это соответствова-

ло тем научным задачам, которые ставились в существовавшей тогда структуре экономики.

После распада СССР в течение десятилетия был существенный провал в финансировании науки и технологий, в этот период мы больше думали о том, как сохранить институты и лаборатории, выплатить зарплаты, а не о том, как купить новейший микроскоп (хотя и это по мере сил делалось). И только в течение последних пяти лет стало возможным покупать самое современное и дорогостоящее оборудование для всех приоритетных направлений развития науки и техники. Кроме того, появились центры с уникальными установками для коллективного пользования.

Но, на мой взгляд, говорить сегодня о том, что наша наука оснащена по последнему слову техники пока рано. Например, если в целом посмотреть на то оборудование, которое установлено в российских академических институтах и, ска-

жем, в аналогичных зарубежных учреждениях типа Института Макса Планка в Германии, конечно, там оно гораздо лучше, новее. Зарубежные лаборатории в ведущих странах оборудованы лучше, чем российские.

– А это означает, что и по качеству научной продукции немецкая наука в целом опережает российскую?

– Конечно, хорошее оборудование и хороший результат связаны между собой. В научные журналы с достойным импакт-фактором принимаются те статьи, которые выполнены на современном оборудовании. В случае, если такового у вас нет, вы не можете опубликовать статью в рейтинговом издании.

Но это – не прямая связка. Есть страны с большими финансовыми возможностями, отличным оборудованием, но без научных школ (скажем, арабские нефтяные страны), в которых дело с публикациями обстоит не очень хорошо, по-

сколько нет собственных научных традиций. За счет дисциплины, трудолюбия и приглашения научных «звезд» они чего-то добиваются, но без собственной научной базы, без ее постоянной подпитки им трудно наверстать отставание. Другое дело – наука интернациональна, можно свои идеи реализовывать на оборудовании, которое имеется у других. Это тоже надо учитывать.

– Наверное, поэтому иностранные научные организации (американские и европейские), обладая новым научным оборудованием, с удовольствием забирают теоретические работы, сделанные российскими учеными. Бывает и так, что с использованием этой теории ставится серия экспериментов, получается в итоге результат мирового уровня, а автору идеи остается лишь первоначальная цитата в статье.

– Конечно, бывает и так, но вряд ли это трагедия для науки и даже для того ученого, который придумал гениальную теорию. В России никогда не было избытка хорошего оборудования. Нынешняя ситуация была и в XIX, и в начале XX века. Можно посмотреть биографии блестящих российских ученых того периода – большая доля экспериментальных работ Мечникова, Вернадского, да и Менделеева была сделана во время работы за границей. Да, мы больше теоретики, нежели практики, всегда в российской науке не слишком пропорционально была развита теоретическая часть по сравнению с экспериментальной.

Современная большая наука – это наука больших коллабораций. Российские экспериментаторы работают частично на своем оборудовании, частично реализуют свои гипотезы и идеи на оборудовании в зарубежных институтах и университетах, лабораториях-партнерах научной группы (это

при условии, что есть хорошие идеи).

В то же время в последние годы у государства появилась возможность закупать современное оборудование. Во многих случаях это наиболее необходимые современные приборы. В том числе в Московском университете начиная с 2004 года очень много нового оборудования было закуплено. Мы и сейчас приобретаем его, но уже в рамках Программы развития МГУ.

– Это оборудование по всему спектру, начиная от осциллографа и заканчивая дорогостоящим силовым микроскопом? Какую-то часть потребностей науки закрывают наши производители?

– Да, это весь спектр оборудования – от простых приборов и реактивов до установок. Что-то из этого мы покупаем у российских производителей, что-то – у зарубежных. Но когда речь идет о крупных современных установках (электронные микроскопы, хроматомасс-спектрометры), мы ориентируемся на зарубежного производителя. Но, скажем, по атомно-силовым микроскопам

Большая доля экспериментальных работ Мечникова, Вернадского, да и Менделеева была сделана во время работы за границей.

есть конкурирующие российские производители. Все зависит от приборов.

– Как вы в МГУ покупаете дорогое научное оборудование? «Дорогое», кстати – это сколько? 100 000 рублей или 30 000 000 рублей?

– Согласно законодательству, все оборудование свыше 100 000 рублей идет на запрос котировок, а свыше 500 000 рублей – на тендеры или аукционы. Как мы закупаем? Объявляем тендеры – за-

купаем оборудование в рамках тендерной процедуры.

Сама по себе процедура не сложная и не слишком обременительная, если бы она действовала в условиях более-менее ритмичного финансирования закупок. Когда деньги поступают к самому концу года, приходится эту процедуру проводить в спешке, что ни к чему хорошему не приводит.

– Как формируются потребности в научном оборудовании в МГУ?

– По-разному, в зависимости от ситуации и от того, по какому пути появляются средства. Есть деньги, которые та или другая группа получает либо по грантам, либо по госконтрактам. Есть контракты с фирмами, в которых предусмотрены деньги на оборудование. Тогда сама группа и решает, какое оборудование им закупить. Большая часть мелкого оборудования приобретается именно по этому каналу. Есть централизованные вещи, например накануне 250-летия Московского университета правительство Российской Федерации выделило МГУ средства на закупку со-

временного оборудования. Были собраны заявки на факультетах, шла работа по их анализу и по возможному объединению. А дальше уже было принято решение комиссией ректората (окончательное решение оставалось за ректором) относительно того, какие установки закупать.

– То есть – это путь от денег? Появились деньги – можно заниматься?

– Да, но чтобы появились деньги, наш ректор академик В.А. Са-

довничий должен был проделать громадную работу. Теперь по центрам коллективного пользования: Минобрнауки было объявлено соревнование ЦКП. Университет подал заявку по нанотехнологиям, и те крупные приборы, которые требовались, были в ней просто поименованы. Университет выиграл эту заявку. Естественно, далее закупились те приборы, которые были в ней перечислены. Сейчас задействована Программа развития МГУ. Комиссией при ректорате были сформулированы приоритетные направления развития Московского университета. И это уже формирование закупок от потребностей централизованного развития, от научных направлений, их семь. В рамках каждого из этих направлений шла работа с учеными, которые работают в этой области. Они подавали и до сих пор подают заявки на нужное оборудование. Опять-таки, эти заявки анализируются, обобщаются – вначале руководителем приоритетных направлений, потом все передается в ректорат. В ректорате уже смотрят на то, что можно и что нельзя закупить в рамках приоритетных направлений в текущем году. Конечное решение относительно того, что именно должно быть закуплено, принимает ректор. Заявки в рамках приоритетных направлений развития были сформулированы. Те деньги, которые пришли в конце 2010 года, были потрачены в очень большой части на два мегапроекта Московского университета: на модернизацию и доведение нашего суперкомпьютера «Ломоносов» до 1.3 петафлоп и на работы по созданию спутника «Ломоносов», который будет запущен в этом году (в честь 300-летия со дня рождения Ломоносова). Есть целый комплекс научных задач, которые будут изучаться этим спутником. Оставшаяся часть денег была потрачена на другие при-

оритетные направления развития. Я думаю, что в этом году большая часть тех заявок, которые были поданы по этим направлениям, будет реализована.

– Повлияет ли на закупки оборудования реорганизация Московского университета, связанная с централизацией управляющих и организационных процедур?

– В той части, о которой я сейчас говорил, никак не повлияет. Потому что речь идет о крупных закупках, которые всегда проходили через Московский университет как единое юридическое лицо. Тендерные процедуры, с тех пор как был принят 94-й закон, всегда соблюдаются.

– А по мелким закупкам подразделения не будут страдать?

– В законе имеется утверждение о том, что есть определенные позиции номенклатуры товаров. По каждой позиции при оплате по счетам данное юридическое лицо не может превышать 100 000 рублей. Если превышает порог по совокупному количеству закупок на данную позицию, в этом случае должны объявляться конкурсные процедуры. Даже если вы превысили порог 100 000 на одну копейку (купили мышку для компьютера), вы уже не можете так просто оформить всю покупку. С этой точки зрения, поскольку МГУ очень большая организация, получается сложная проблема. Она связана с тем, что даже маленькие закупки необходимо будет группировать и проводить путем конкурсных процедур. Эту проблему мы видим и предпринимаем меры, которые направлены на то, чтобы это не повлекло за собой какое-либо осложнение работы научных групп, функционирующих в Московском университете. В частности, рекомендовано всем факультетам объявлять в начале года (пока денег все равно нет) тендеры с поэтапной вы-

боркой на максимально широкий круг, ассортимент товаров и услуг по данной позиции номенклатуры закупок.

– Что это такое?

– За основу можно взять то, что было закуплено в прошлом году. Смотрим каталоги и думаем, что в принципе еще может понадобиться, все включаем, определяем максимальную стоимость каждой позиции. Это выставляется на тендер. Выигрывает некая крупная компания-поставщик. Они могут конкурировать между собой в ходе тендера. Но поскольку выборка поэтапная – что это означает? Там максимальные объемы товаров по каждой позиции указаны, но мы не должны сразу выбирать 100%. Мы можем выбрать 80%, причем поэтапно в течение года, по мере возникновения потребности. По мере возникновения необходимости подразделение просто обращается в компанию, которая выиграла: «Поставьте нам сегодня 20 пачек бумаги, а завтра еще 30» и т.д. Они поставляют. Сроки поставки должны быть в этих тендерах поэтапной выборкой оговорены, оплата происходит ежемесячно или ежеквартально по факту поставок.

– Бывают ли «чудеса» на тендерах? Я имею в виду случаи, связанные с нашим непревзойденным 94 ФЗ.

– Бывает, куда же без этого. Особенно когда кризис разразился, многие подобные компании появились и начали вести свою деструктивную деятельность. У отдела закупок уже есть способы борьбы с определенными типами компаниями, которые специально создаются для злоупотреблений.

Безусловно, 94 ФЗ для научной сферы не подходит. Но, с другой стороны, я сейчас скажу очень непопулярную вещь. Научные учреждения действуют не в безвоздушном пространстве. И если мы говорим, что в нашем обществе

весьма низок уровень общей культуры и моральных ограничений, то почему научная сфера должна быть исключением? Конечно, злоупотребления есть. Например, несколько счетов выписываются на однородные группы товаров, да еще иногда товар закупается ученым на фирме, которую он же и возглавляет. Такие вещи кое-где порой встречаются.

Я бы сказал по-другому: отмена 94-го закона должна сопрягаться с общим изменением процедур и организации анализа научных проектов в целом в Российской Федерации. Сейчас, к сожалению, у нас система очень формальная. Есть конкурсы Минобрнауки, проекты РФФИ. Естественно, по каждому проекту подаются отчеты, но они очень формальные. Там

драться не может. Вот такая ситуация является питательной почвой для разных злоупотреблений. Отчет должен быть по сути: что вы сделали? Если человек опубликовал в ведущих журналах 10 статей, которые хорошо цитируются за эти годы – все, он победитель. Победителей, как известно, не судят. Он может делать все, что угодно. Он достиг результата. Если будет четкий контроль над тем, что человек сделал, то тогда и не нужен 94-й закон. А если ситуация такая, как сейчас: он формально что-то выполнил, а фактически ничего не сделал, 94-й закон требуется. При такой ситуации с отчетностью, да если еще не будет 94 ФЗ, недобросовестный деятель и будет обналичивать деньги, выписывая

коммерцией. Ходят разные хорошие слухи по поводу того, что этот самый Академинторг слишком накручивает посредническую маржу, что вступает в сговоры с поставщиками и т.д. Может быть, поскольку закон «О науке» и устав Академии позволяют децентрализовать закупку оборудования, отдать эти полномочия НИИ РАН?

– Мне кажется, что Академинторг – это совершенно лишняя инстанция. Я незнаком с механикой перевода денег в РАН, но если деньги можно перевести институту, и он сам может объявить тендеры (те ученые, которые реально работают, смогут помочь это сделать квалифицированно), то это более оптимальный вариант, нежели устройство странного тендера на большое количество оборудования. Я понимаю, что Академинторг играет роль «большой компании-поставщика». Когда речь идет о поставках бумаги, канцелярских принадлежностей, даже реактивов – я это могу понять. Но когда речь идет о большом оборудовании, каждая из частей которого крайне специфична, то процедуру будут проводить гораздо более квалифицированно в институтах. Тем более, что институты сейчас уже проводят много тендеров, потому что они по тем же причинам (из-за 94 ФЗ) должны закупать многие реактивы и прочие вещи...

– То есть Вы считаете, что аргумент на тему «В институтах нет специалистов, которые в состоянии заниматься сложными тендерами» не очень состоятелен, потому что институты давно научились это делать?

– Давно уже научились и делают. Во всех институтах есть тендерные комиссии. Аргумент совершенно несостоятелен. Можно работать без всякого Академинторга. Откровенно говоря, я не хотел бы быть голословным, но по тому, что я знаю,

Если мы говорим, что в нашем обществе весьма низок уровень общей культуры и моральных ограничений, то почему научная сфера должна быть исключением?

важно выполнить какие-то пункты технического задания. Вы это сделали? Все!

– Конечно, и придаться почти невозможно, особенно если это научная работа.

– В научной работе должно быть не так. В ней должна быть действительно хорошая экспертиза того, что сделано, основанная на реальных достижениях группы. А достижения очень просто количественно оцениваются – те статьи, которые удалось опубликовать в ходе работы, в каких журналах, какие результаты получены. Как только это становится во главу угла, тогда 94 ФЗ не нужен. А так вы сделали какую-то ерунду, формально соблюли все требования ТЗ-лота, подали отчет – и к вам никто при-

счета по 99.9 тысяч рублей. Причем даже не в его фирму, а в ту фирму, с которой он предварительно все обговорил.

– Поскольку Вы занимаете определенное положение в Российской академии наук, уместно спросить о том, как происходят закупки научного оборудования в системе РАН. Насколько я представляю себе, там есть специально созданная комиссия по приборам и оборудованию, на нее направляется снизу вал заявок на научное оборудование, все это анализируется, согласовывается и выставляется на торги. Но при этом торги выигрывает все время одна и та же организация, созданная Академией в форме унитарного предприятия – Академинторг, имеющий право заниматься

выходит: никаких особо ценных специалистов там нет. Я не могу комментировать слухи, но они же есть... Когда речь идет о поставке бумаги, пусть этим занимаются фирмы-поставщики. А когда речь идет о крупных приборах, слишком велика выгода для компаний, их поставляющих, плюс велик соблазн для представительств этих компаний в России наладить специальные отношения с той фирмой, которая будет покупать. Когда есть такая возможность...

– Мне кажется, что все слухи довольно легко проверить. Для этого нужно создать независимую комиссию. Ее можно создать даже в системе РАН из других людей, которые с этим не связаны, скажем, из университетских профессоров, которые являются членами Академии. Думаю, у них хватило бы эрудиции разобраться в счетах-фактурах или каталогах продукции, не бинном Ньютона.

– Разумеется. Но я пока знаю только один случай, когда в системе Академии наук обращаются к некоему суждению людей, которые находятся вне РАН. Это Программа молекулярной

и клеточной биологии академика Г.П. Георгиева. Там, в принципе, все очень прозрачно и открыто. Все находится в Интернете: почему дали грант, почему не дали грант. Там есть возможность апелляции: неправильно-де посчитали, интерпретировали факты. Апелляционная комиссия формируется в основном из профессоров Московского университета (и других вузов), которые работают вне системы Академии наук.

– Вы несколько раз обращались в ходе интервью к теме прозрачности всех процедур. Наверное, если говорить о закупках научных приборов, это означает, что Вы являетесь сторонником любой схемы, лишь бы она была разумна, проверяема (прозрачна)?

– Вы очень правильно упомянули — должна быть внешняя экспертиза любой схемы: лотов, проектов, закупок и т.д. В принципе, научное сообщество в мире достаточно часто проводит всякие мероприятия, связанные с внешней экспертизой. Всегда эту экспертизу проводят люди, которые находятся вне системы.

Например, я довольно часто участвую в комиссиях, которые проверяют научную состоятельность или деятельность того или иного европейского научного института или фонда.

– А нашего? Есть же проверочные комиссии РАН?

– Нет, это не очень эффективно. Я участвую в работе американского National Science Foundation, рецензирую проекты. В Голландии очень часто меня приглашают, чтобы Международная экспертная панель могла оценить заявки на гранты, а вовсе не нидерландские ученые. Поэтому мне кажется, надо более активно интегрироваться в мировое научное сообщество, активнее привлекать зарубежных экспертов для оценки того, что у нас делается. Может, тогда и не нужен будет 94 ФЗ. Человек понимает: даже если он выполнил все требования проекта, придут его коллеги из-за рубежа, увидят, что он в ходе означенного проекта нагородил, и станет ему стыдно. Может быть, это и есть некое противоядие? Конечно, должна быть внешняя экспертиза всего на свете. Тогда многие ограничения могут быть сняты. ●

БиоБиблиометрия

Публикационная статистика наук о живом

Библиометрия сейчас меняет все устройство науки. Подсчет и изучение публикаций и ссылок в научных журналах кажутся магическим инструментом, который позволяет объять необъятное – измерить в цифрах талант, успешность, роль в истории науки и человечества.

Несмотря на целые потоки критики, с каждым днем подсчет ссылок и индексов завоевывает все больше сторонников. Согласно проекту официальной Инновационной стратегии РФ, к 2020 году 5% всех новых статей в базе Web of Science должны быть написаны российскими авторами – таков индикатор успешности реформы науки, который ставят в Минэкономки. Наша нынешняя доля – около 2.5%, еще десять лет назад было 3.5% – неслучайно специалисты относятся к указанным в проекте стратегии цифрам с большим скептицизмом.

Столь же показательным стал конкурс «мегагрантов» Минобрнауки: чиновники открыто говорят о высоких индексах Хирша, которыми должны обладать претенденты на миллионное финансирование. В более скромных конкурсах министерства участникам теперь также предлагается внести сведения о числе ссылок на свои публикации.

Стартующая в этом году оценка результативности организаций государственной гражданской науки вызывает массу споров – во многом из-за того, что неудовлетворительные библиометрические показатели могут привести к закрытию ряда НИИ. Эти же показатели широко используются для измерения эффективности

развития национальных исследовательских и федеральных университетов.

На уровне отдельных организаций тоже появилась масса программ стимулирования сотрудников, активно публикующихся в авторитетных журналах. Тип поощрения зависит от характера организации: где-то из-под палки пользуются чуть подправленным ПРНД, где-то разрабатывают собственные правила, по которым авторы «Nature» и «Science» могут получать в пять раз больше своих менее активных коллег.

Читателям нашего журнала нет смысла рассказывать о том, что любые библиометрические показатели надо трактовать с осторожностью. Существует масса факторов, не позволяющих говорить об однозначной связи между показателями и реальными научными заслугами отдельного ученого, организации,

страны. Однако многие ученые по всему миру все больше зависят от библиометрии в своей работе, ориентируясь на цифры для самооценки и планирования. Доходит до смешного: западные исследовательницы, выйдя замуж и сменив фамилию на новую, в науке продолжают пользоваться девичьей, уже индексированной в библиометрических базах.

Следует признать, что биомедицина, молекулярная биология, биоинформатика и прочие передовые дисциплины наук о живом годятся для публикационного анализа гораздо лучше математики или, например, археологии. Дело в огромном объеме биологических публикаций, скорости их выхода, наличии множества цитирований. Средний профессор – молекулярный биолог – публикует гораздо больше статей, чем его коллега-математик, и ссылаются на эти статьи чаще.

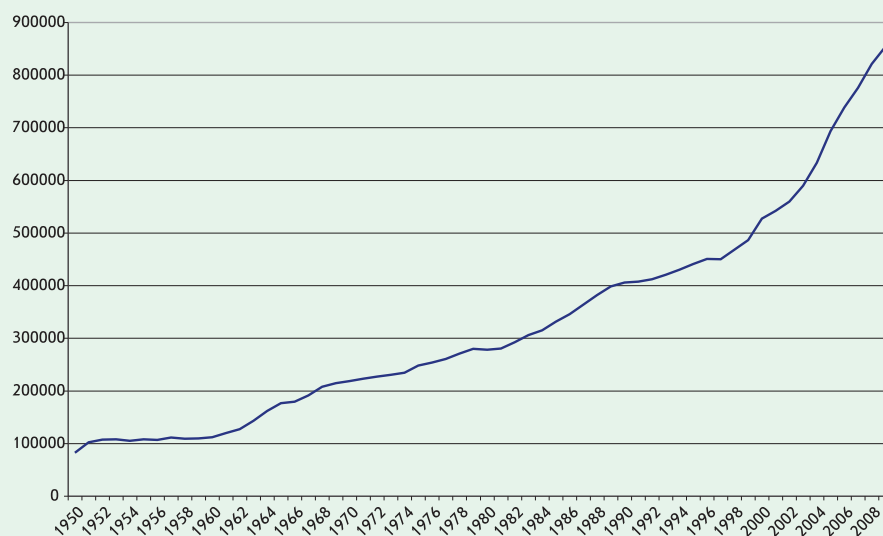


Рис. 1. Публикации в базе MEDLINE (разбивка по годам, 1950–2009 гг.).

Тем не менее, даже в биологии оценка отдельных ученых и публикация их рейтингов нам кажется недостаточно корректной. Гораздо надежнее обратиться к сводным индикаторам по странам и организациям – большие массивы публикаций позволяют выявлять реальные изменения в науке.

Основным инструментом повседневной работы с публикациями для медика и биолога служит PubMed – система поиска данных в базе MEDLINE. Эта база создана Национальным институтом здоровья США и содержит сведения о публикациях из примерно 5000 научных журналов за несколько десятков лет. Сейчас в нее входит

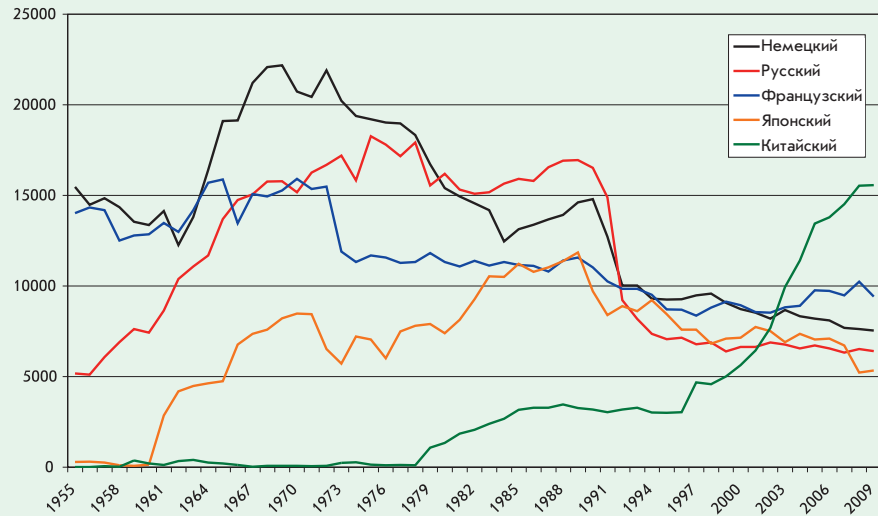


Рис. 2. Основные второстепенные языки науки. Число новых публикаций в базе MEDLINE в 1955–2009 гг.

Сергей Кочетков, профессор, член-корр. РАН

Представленная статья, безусловно, чрезвычайно полезна для читателей «Acta Naturae» и всех научных работников. Действительно, роль библиометрии в последние годы все более возрастает и будет возрастать и впредь. Мне представляется, что данная статья объективно и взвешенно оценивает настоящее состояние вещей.



Из статьи видно, что сегодня состояние российской науки далеко не блестяще, на что существуют как объективные, так и субъективные причины. Объективной причиной является, без преувеличения, преступное отношение государства к науке на протяжении последних двадцати лет. Причем ссылки на кризис, «лихие девяностые» и прочие причины вряд ли можно принимать во внимание. Речь скорее идет в лучшем случае о непонимании, а в худшем – о намеренном игнорировании роли науки в развитии современной экономики, следствием чего стало превращение второй научной державы в мире в сырьевой придаток развитых стран. Принимаемые в последнее время меры по улучшению положения пока, на мой взгляд, не слишком эффективны (анализ причин этого выходит за рамки данного комментария). Хочется, однако, отметить, что в сложившейся ситуации бездумное применение библиометрических показателей для деления российских ученых на «чистых» и «нечистых» может эту ситуацию только усугубить.

Субъективные причины падения числа публикаций российских ученых в иностранных журналах связаны с редакционной политикой последних и, не в последнюю очередь, с увлечением теми же библиометрическими показателями. Действительно, многие редакторы международных журналов в частных беседах признаются, что российские публикации зачастую не уступают по качеству соответствующим западным. Однако погоня за импакт-фактором журнала вынуждает редакторов отвергать значительное число присылаемых статей. В этом случае российские статьи чаще других становятся жертвой, поскольку, к сожалению, в том числе и в силу указанных выше объективных причин, российская наука недостаточно интегрирована в мировую науку, а российские ученые (за некоторыми исключениями) не являются в достаточной степени «своими» для международного сообщества. К сожалению, исправление этого положения невозможно без существенных изменений в научной политике государства, и даже при создании соответствующих условий займет немало времени. В этой связи еще раз хочется подчеркнуть, с одной стороны, безусловную необходимость использования библиометрических показателей как единственных критериев, в какой-то степени отражающих объективную реальность. С другой стороны, эти показатели не должны быть поставлены во главу угла. Российская наука больна, и радикальное лечение должно служить излечению пациента, а не снятию проблем за счет его смерти.

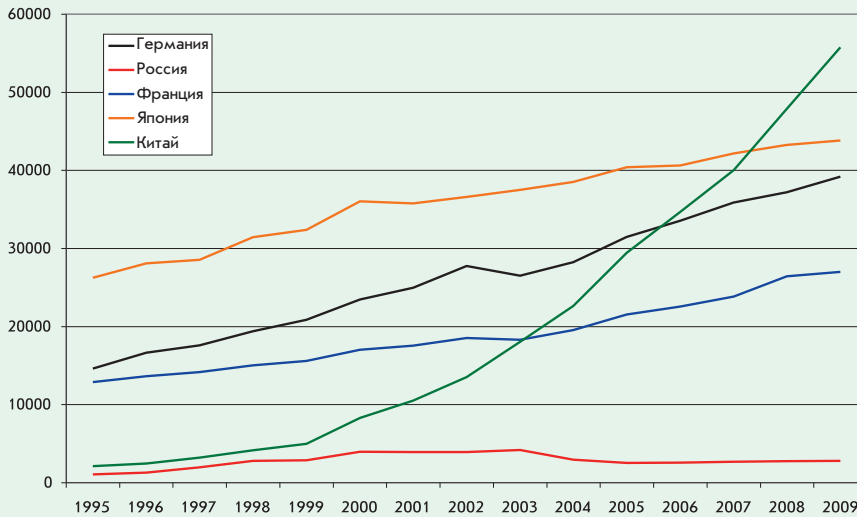


Рис. 3. Публикационная активность ряда стран. Число новых публикаций в базе MEDLINE в 1995–2009 гг.

около 20 млн публикаций. Увеличение числа статей, поступающих каждый год в MEDLINE, хорошо отражает общий подъем интереса к life sciences в нашу эпоху (рис. 1).

В ближайшие 3–5 лет число новых научных и околонаучных текстов по медицине и биологии в MEDLINE превысит знаковый рубеж – 1 млн в год. Важно, что обрабатываются тексты не только на английском, но и на остальных распространенных в науке языках. Такой уникальный массив данных позволяет проследить, как эти языки боролись с английским и проиграли (рис. 2).

Сергей Деев, профессор, член-корр. РАН

Стремление к цифровой оценке продуктов научного труда породило и продолжает порождать разработку соответствующих критериев. Среди наиболее известных и активно используемых в настоящее время – импакт-фактор, созданный 50 лет назад Гарфилдом, и новый наукометрический показатель, предложенный 5 лет назад, – так называемый индекс Хирша, который является количественной характеристикой продуктивности ученого, основанной на количестве его публикаций и количестве цитирований этих публикаций. Каждый из этих (и целого ряда других) критериев не идеален, и можно привести яркие примеры, когда выдающиеся ученые по таким формальным характеристикам оказались бы аутсайдерами. Однако четкие формализованные библиометрические показатели могут и должны служить основой для оценки труда ученых. При этом субъективность такой оценки для отдельного ученого всегда будет выше, чем для научных учреждений в целом. Поэтому указанные показатели особенно полезны для сравнения научных институтов и выявления среди них лидеров. Но не следует считать эти формализованные показатели единственным и решающим критерием. В каждой системе оценок, основанной на статистических данных, существуют недостатки. И экспертную оценку коллегами «по цеху» нельзя ничем заменить. Особенно эффективной и объективной была бы экспертиза, проводимая независимыми и незаинтересованными специалистами из других ве-



домств, в идеале – зарубежными учеными. Заранее известные критерии, прозрачность и гласность принимаемых решений при такой экспертизе минимизируют ошибки и в научном сообществе вызывают только уважение. В качестве удачного примера организации экспертизы можно привести программу Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

И еще одно, о чем можно упомянуть, говоря о библиометрии. Идет много разговоров о трудностях публикации статей российскими учеными в высокорейтинговых зарубежных журналах. Это действительно так. И причин тому много. Но тем веселее должна быть оценка коллективов, которым, несмотря ни на что, удается это сделать. С другой стороны, нередко приходится слышать, что российская наука должна противопоставить Западу широкий набор российских периодических научных изданий. Главные редакторы и члены редколлегий этих журналов предпринимают героические усилия для поднятия престижа национальных изданий. Однако архаичная система организации издательского процесса большинства российских журналов, скудность финансирования и, как следствие, плохое качество перевода и запоздалый выход английских версий журналов являются крайне негативными факторами, которые не позволяют основной массе национальных изданий иметь достойные значения импакт-факторов. Неудивительно, что авторы наиболее интересных результатов стремятся публиковать их за рубежом, что не способствует цитируемости наших журналов и, в свою очередь, отрицательно сказывается на импакт-факторах национальных изданий.

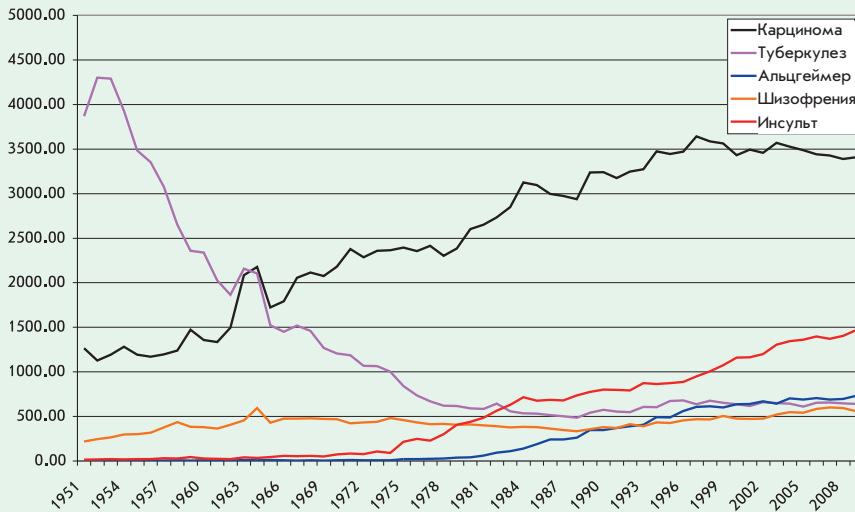


Рис. 4. Относительное число статей, посвященных некоторым биомедицинским проблемам (1951–2009, MEDLINE).

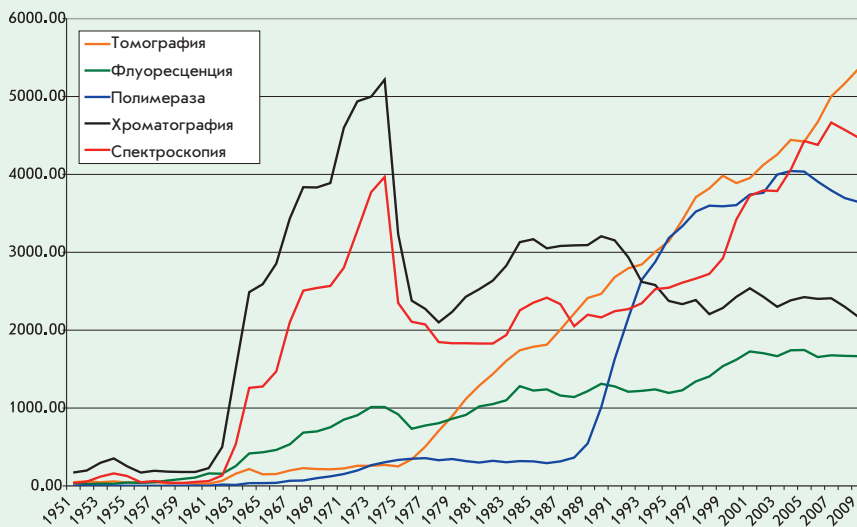


Рис. 5. Относительное число статей, упоминающих определенные экспериментальные и клинические технологии (1951–2009, MEDLINE).

Как видим, распад социалистической системы ударил не только по нам, но и по Германии. Как бы то ни было, сейчас львиная доля всех текстов в MEDLINE – на английском языке. Процент англоязычных публикаций вырос с 46 до 93% за 1955–2009 г. Судя

по росту общей публикационной активности, все переходят на английский. Вот распределение опубликованных в 1995–2009 гг. текстов по странам аффилиации авторов (к сожалению, далеко не все статьи в MEDLINE имеют правильно проиндексированную

аффилиацию, поэтому обращать внимание здесь следует скорее на динамику, чем на абсолютные цифры) (рис. 3).

Много интересного можно узнать и о содержании статей, о смене популярных тематик. Мы подсчитали число статей за каждый год с 1951 по 2009 для ряда медицинских терминов, имеющих важное социальное и экономическое значение. Использовался относительный показатель (число статей с данным термином на 100 тыс. статей) (рис. 4).

Точно так же можно следить и за развитием методов и технологий исследований (рис. 5).

Вернемся к российской науке. Главный отечественный библиометрический продукт – Российский индекс научного цитирования (РИНЦ) в составе Научной электронной библиотеки eLIBRARY.ru. Он создан на средства Минобрнауки и включает сведения о публикациях из нескольких тысяч российских научных журналов. Недавно в РИНЦ была интегрирована информация о публикациях российских авторов в зарубежных журналах из базы Scopus. Общее число изданий, в той или иной мере охваченных индексом, превысило 30 тыс.

Многие ученые критикуют РИНЦ как за самую ориентацию на российские журналы, так и за многочисленные неточности, дублирования и ошибки. Однако последних становится все меньше, а включение данных Scopus должно решить проблему с публикациями в иностранных журналах. Тем не менее, РИНЦ заметно отличается от самой авторитетной в мире библиометрической базы Web of Science. Для наглядности приведем две версии топ-10 журналов биологического профиля по величине импакт-фактора (ср. табл. 1 и 2).

Таблица 1. Импорт-факторы российских журналов в области наук о живом за 2009 г., Web of Science Journal Citation Reports

№	Журнал	Импакт-фактор
1	Biochemistry (Moscow)	1.327
2	Applied Biochemistry and Microbiology	0.67
3	Microbiology	0.638
4	Molecular Biology	0.57
5	Russian Journal of Genetics	0.501
6	Russian Journal of Plant Physiology	0.5
7	Russian Journal of Bioorganic Chemistry	0.473
8	Russian Journal of Ecology	0.414
9	Zhurnal Obshchei Biologii	0.377
10	Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology	0.267

Таблица 2. Импорт-факторы российских журналов в области наук о живом за 2009 г., РИНЦ. Коэффициент самоцитируемости показывает долю ссылок из данного журнала в общем числе ссылок на статьи, опубликованные в данном журнале

№	Журнал	Импакт-фактор	Всего статей в РИНЦ	Коэффициент самоцитируемости, %
1	Microbiology	1.69	1953	н/д
2	Биомедицинские технологии и радиоэлектроника	0.951	135	0
3	Геофизические процессы и биосфера	0.852	106	62.5
4	Физиология человека	0.757	705	27.8
5	Молекулярная биология	0.67	1075	17
6	Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии	0.645	390	20
7	Врач и информационные технологии	0.644	376	17.2
8	Биохимия	0.588	1785	27.4
9	Russian Journal of Nematology	0.538	106	н/д
10	Успехи современной биологии	0.514	295	17.6

Таблица 3. Институты РАН биологического профиля – лидеры по числу цитирований публикаций, вышедших в 2005–2009 гг., РИНЦ

Организация	Публикации (А)	Цитирование (В)	Финансирование, тыс. руб. (С)	В/А	С/А	С/В
Институт биоорганической химии	1337	6103	315617	4.56	236.1	51.7
Институт молекулярной биологии	1078	4035	116096	3.74	107.7	28.8
Институт цитологии и генетики СО	1488	3237	н/д	2.18	н/д	н/д
Институт общей генетики	696	3063	85421	4.4	122.7	27.9
Институт биологического приборостроения	138	2671	69773	19.4	505.6	26.1
Зоологический институт	1504	2548	117026	1.69	77.8	45.9
Институт микробиологии	704	2143	51701	3.04	73.4	24.1
Институт молекулярной генетики	530	1968	74457	3.71	140.5	37.8
Институт биохимии	684	1950	103580	2.85	151.4	53.1
Институт проблем экологии и эволюции	1419	2002	215157	1.41	151.6	107.5
Институт цитологии	726	1871	105806	2.58	145.7	56.6
Институт теоретической и экспериментальной биофизики	921	1945	127707	2.11	138.7	65.7
Институт биохимической физики	1285	1812	138538	1.41	107.8	76.5
Институт белка	329	1592	67366	4.84	204.8	42.3
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО	559	1576	н/д	2.82	н/д	н/д

Предстоящая оценка эффективности институтов Академии наук будет широко опираться на библиометрию. Уже сейчас РИНЦ позволяет рассчитывать для отдельных организаций массу индикаторов.

Мы выделили 15 НИИ РАН биологического профиля – лидеров по числу цитирований статей,

опубликованных в 2005–2009 гг. (табл. 3). В качестве показателя размера организации используется сумма планового финансирования через РАН в 2011 г.¹ Нужно отметить, что тематики, в кото-

¹ Постановление Президиума РАН № 285 от 21.12.2010 «О разработке плана финансирования научных учреждений РАН на 2011 год».

рых работают Зоологический институт и Институт проблем экологии и эволюции, во всем мире цитируются в среднем ниже, чем молекулярная биология, биоинформатика и т.п.

Организаций биологического и медицинского профиля у нас множество, однако среди них нет таких, которые могли бы соревно-

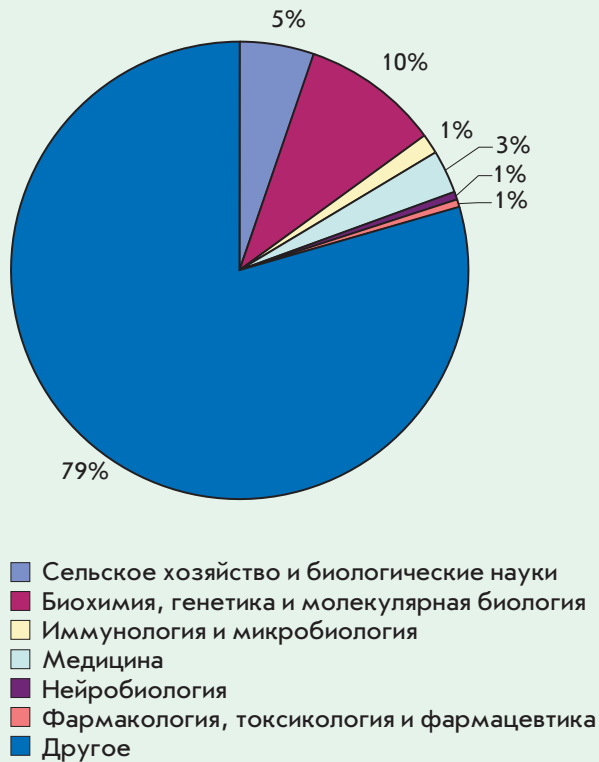


Рис. 6. Веса отдельных наук о живом в общем потоке публикаций российских авторов за 2009 г., Scopus. N = 33690.

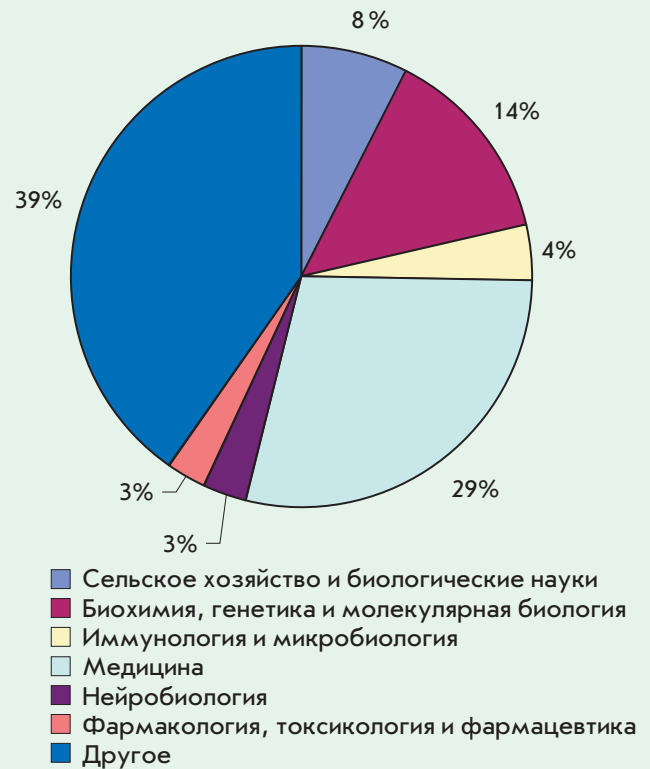


Рис. 7. Веса отдельных наук о живом в общем потоке публикаций авторов из США за 2009 г., Scopus. N = 415057.

ваться в цитируемости с физическими институтами. Если ранжировать все включенные в РИНЦ организации по числу цитирований, то первый биологический институт (ИБХ) встретится лишь в конце второй десятки.

Чтобы наглядно продемонстрировать, какое место науки о жизни занимают в общем потоке публикаций из России, восполь-

зуемся базой Scopus, в которой индексируется 18 тыс. международных журналов (рис. 6).

Достаточно сравнить с США, чтобы увидеть огромную разницу. Библиометрия свидетельствует, что life sciences до сих пор находятся в России на вторых ролях (рис. 7).

Учитывая возросший интерес к библиометрии и ее значение

в управлении наукой, мы планируем регулярно публиковать обновленные показатели для life sciences. ●

Иван Стерлигов

ivan.sterligov@gmail.com
http://blogs.strf.ru/my/Ivan_Sterligov

Раковый геном: что нового

По материалам 4-й ежегодной конференции участников консорциума ICGC по изучению генома раковых клеток, 1–3 декабря 2010 года, Брисбен, Австралия



Е. Б. Прохорчук,

Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1

E-mail: prokhortchouk@biengi.ac.ru

Прошло восемь месяцев с момента объявления о создании консорциума ICGC по изучению генома раковых клеток [1], и прошедшая конференция должна была показать, насколько хорошо стартовали все участники. Напомню, что сам консорциум формально был организован в 2008 году усилиями, в первую очередь, европейских ученых с целью консолидированного и координированного изучения генома раковых клеток. Необходимо отметить, что в США аналогичный проект, названный TCGA – The Cancer Genome Atlas (<http://tcga.cancer.gov/>), запустили на несколько лет раньше, но договорились, что TCGA становится частью ICGC. Это решение безусловно пошло на пользу европейцам, поскольку открыло доступ ко многим американским базам уже накопленных знаний. Создание ICGC стимулировалось, в первую очередь, технологическим прорывом в определении нуклеотидной последовательности ДНК, что позволило перейти от аналогового сигнала на микроматрицах к цифровому – на секвенаторах NGS. Сегодня в консорциуме участвуют 12 стран – Италия, Испания, Франция, Германия, Великобритания, США, Канада, Индия, Китай, Австралия, Япония, к которым, как было объявлено, присоединяется Мексика. Какая страна «отвечает» за тот или иной вид рака, можно посмотреть на сайте консорциума <http://www.icgc.org>.

На конференции в Брисбене объявили объем общего бюджета ICGC, который впечатлил многих участников – 500 миллионов долларов. Именно на такую сумму правительства стран-участниц заключили контракты со своими национальными исследовательскими центрами, институтами и университетами на проведение исследования как минимум 12100 «раковых» геномов. На каком же этапе сегодня находятся отдельные проекты, и что больше всего волнует участников?

Каждый проект, или мини-консорциум по конкретному виду рака, делегировал одного докладчика, который и обрисовывал общее состояние дел. Структура практически всех исследований оказалась одинаковой. Первый шаг – сбор клинического материала. На этом этапе основная роль чаще всего принадлежит клиникам, хирургам и онкологам. Они отвечают за сбор и хранение материала, историю болезни и выбор схемы лечения больного. Далее необходимо получить подробное гистологическое описание клинического материала. К примеру, в финансируемом за счет Седьмой рамочной программы консорциуме по раку почки CAGEKID (Cancer Genomics of Kidney) срезы опухоли, зафиксированной в формалине, должны анонимно оценить три независимых онколога. И только в том случае, если они придут к единому мнению о гомогенности (не менее 90% раковых клеток

на срезе) материала и стадии прогрессии опухоли, а это может быть выражено количественно с погрешностью не более 5%, соседний срез, хранящийся в морозильнике, будет использован для выделения ДНК и РНК. Проблему гетерогенности опухолевого материала отмечали все докладчики. Загрязнение образцов стромальными клетками и попадание в операционный материал нескольких опухолевых очагов – вот основные причины того, что из сотен пар образцов опухоль/контроль до молекулярно-генетического исследования доходит не более 10%. Некоторые лаборатории (John McPherson, Канада) пытаются обогащать клеточный материал при помощи проточного цитофлуориметрического сортирования (все попытки не самые удачные) или используют ксенотрансплантаты в мышах с иммунодефицитом (а вот здесь удается получить достаточно существенное обогащение). Все мини-консорциумы практически едины в методах анализа нуклеиновых кислот на последующих стадиях. Вот что чаще всего секвенируют в паре опухоль/контроль исследователи ICGC: 1) геном с глубиной покрытия $\times 30$ – $\times 50$; 2) транскриптом; 3) экзом; 4) репертуар микроРНК; 5) высокометилованные ДНК. В среднем все мини-консорциумы (быть может, за исключением «продвинутого» TCGA и совсем молодых консорциумов, таких, как немецкий проект «Геномика

рака предстательной железы») достигли приблизительно одинакового уровня. Как правило, по состоянию на декабрь 2010 года с помощью NGS (Illumina или SOLiD) удалось секвенировать геномы не более 10 пар опухоль/контроль и не более нескольких десятков транскриптомов или экзонов. Данные по метилированию ДНК или репертуару микроРНК ни один из мини-консорциумов не привел. Это и неудивительно, поскольку большинство команд стали получать финансирование с начала или середины 2010 года. Однако уже к следующему 5-му съезду ICGC, который состоится в июле 2011 года в Токио, практически все обещают вплотную подойти к 30–50 геномам и нескольким сотням экзонов/транскриптомов. И лишь американская часть консорциума обещает через два года приблизиться к 3000 ресеквенированным раковым геномам. Справедливости ради стоит отметить, что 3000 геномов в американской программе возникли как совокупное усилие всех институтов по всем изучаемым ими онкопатологиям. Значительное внимание привлекает политика консорциума в отношении подтверждения данных, полученных с помощью NGS. К примеру, в институте Броуда, США (Gad Getz) сначала накапливают данные о 30–40 геномах, находят мутации в раковых геномах и только потом с использованием баркодирования и альтернативных методов секвенирования (по Сэнгеру или 454) доказывают существование мутаций в ампликонах. Наконец, на вершине этих технологических цепочек находится биоинформатический анализ, позволяющий выделить соматические мутации, которые произошли только в опухолевых клетках, но не в нормальной ткани, прилегающей к опухоли /или в клетках крови. Широко упоминались базы данных таких

мутаций, созданные в Сэнгеровском институте (Великобритания) – COSMIC (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>), а также базы TCGA (<http://www.broadinstitute.org/tcga/> пароль: tcga логин: tcga). Ни один из докладчиков не упомянул мутации в межгенных участках или в промоторах. Наоборот, о кодирующих районах, а также о местах экзон-интронной стыковки было сказано предостаточно. По предварительным данным NGS, оказалось, что в опухолевых клетках в среднем возникает около 100 соматических мутаций (при пороге p value, равном 10^{-5}), причем в опухолях различной этиологии эти величины очень близки. Итак, какие же гены наиболее часто подвергаются мутированию? Абсолютный лидер – TP53 – от 85 до 96% в зависимости от типа опухоли. Упоминали также ген VHL в случае рака почки, MUC17 при раке желудка, CTNБ1 (β -катенин) при раке кишечника и много других. Вполне резонно возникает вопрос, а стоило ли тратить полмиллиарда долларов, чтобы узнать, что уже хорошо известные гены – супрессоры опухолевого роста – мутированы, а онкогены либо амплифицированы, либо имеют повышенный уровень транскрипции? Ответом на это стала лекция проф. Роба Сазерленда (Rob Sutherland), первым предложившим антиэстрогеновую терапию при раке молочной железы. Он совершенно четко сказал, что схема терапии каждого отдельного больного будет выбираться в зависимости от «генотипа» мутаций именно в его опухоли. Ярким примером может служить Herceptin, эффективный только при HER2+–злокачественных новообразованиях молочной железы. Верно и обратное, мутации могут нарушать какой-то метаболический путь в опухолевых клетках, поэтому лекарственное средство, блокирующее это нарушение,

может быть найдено среди препаратов, далеких от применяемых в онкологии. Таким образом, верны обе концепции – и «правильное лекарство для данной опухоли», и «правильная опухоль для данного лекарства». Такая смена парадигмы фармацевтики может существенно ускорить и улучшить результаты клинических испытаний противоопухолевых препаратов. Это означает, что в будущем мы станем свидетелями целой серии экспериментов по нахождению корреляции между полногеномным генотипом мутаций в опухоли и наиболее эффективным методом противоопухолевой терапии. Именно это и является глубинной целью консорциума ICGC, а именно, переход к персонифицированной терапии онкобольного. Отдельными темами для обсуждения стали вопросы биоинформатической обработки генетической информации. При значительном снижении стоимости геномного секвенирования увеличивается объем генерируемых данных. Для обработки, хранения и предоставления доступа к полученным результатам требуются все большие и большие компьютерные ресурсы, стоимость которых компенсирует падение цен на секвенирование и приводит даже к удорожанию всего исследования. Как долго продолжится гонка за раковыми геномами, покажет время, а пока темп исследований только возрастает, и консорциум ожидает новых участников с новыми проектами. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hudson T.J., Anderson W., Artez A., Barker A.D., Bell C., Bernabé R.R., Bhan M.K., Calvo F., Eerola I., Gerhard D.S., et al. // Nature. 2010. V. 464(7291). P. 993–998.

УДК 577.218

Молекулярно-физиологические механизмы функционирования мембранных рецепторных систем

Е. С. Северин^{1*}, М. В. Савватеева²¹Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, 117149, Москва, Симферопольский б-р, 8²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119899, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: e.severin@mail.ru

Поступила в редакцию 16.11.2010 г.

РЕФЕРАТ Молекулярная физиология представляет собой новую междисциплинарную область фундаментальных знаний о работе сложных биологических систем. Живая клетка – самая простая и одновременно сверхсложная биологическая система. После расшифровки генома человека молекулярная физиология на новом уровне исследует сложные системы клеточных взаимодействий на основе знаний о пространственной организации и функций рецепторов, их лигандов и белок-белковых взаимодействий. Достижения молекулярной физиологии последних лет связаны с изучением механизмов сенсорной рецепции и межклеточной передачи информации, молекулярной физиологии иммунной системы и других процессов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА молекулярная физиология, рецепторный портрет, вторичные мессенджеры, таргетные препараты, эпигенетическая диагностика, рак предстательной железы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДГПЖ – доброкачественная гиперплазия ткани предстательной железы; ПИН – простатическая интраэпителиальная неоплазия; ПСА – простатспецифический антиген; РПЖ – рак предстательной железы; AMACR (Alpha-methylacyl-coenzyme A Racemase) – метилацил-CoA-рацемеза; CGI – CpG-островок; DAG (Diacylglycerol) – диацилглицерин; DD3 (Differential Display Code 3) – высокоспецифичный для РПЖ ген *DD3*; EPCA (Early Prostate Cancer Antigen) – ранний антиген рака предстательной железы; *ERG4* – ген фактора транскрипции семейства ETC; *ETC* – ген фактора транскрипции, семейство факторов транскрипции; *ETV1* – ген фактора транскрипции семейства ETC; EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) – рецептор эпидермального фактора роста; GSTπ1 (Glutathione-S-Transferase π1) – глутатион-S-трансфераза класса π1; IP3 (Inositol Trisphosphate) – инозиттрифосфат; *RARβ2* (Retinoic Acid Receptor Beta 2) – ген рецептора β2 ретиноевой кислоты; *RASSF1A* (RAS Association Domain Family Protein 1A) – ген белка семейства доменов, ассоциированных с RAS; *TMPRSS2* (Transmembrane Serine Protease 2) – ген трансмембранной сериновой протеазы 2.

Рассматривая механизмы функционирования мембранных рецепторных систем, в первую очередь необходимо отметить успехи молекулярной физиологии в области регуляции процессов, протекающих в клетке, а также внутриклеточной передачи гормональных сигналов. В настоящее время концепция вторичных мессенджеров (вторичных посредников) по праву считается основополагающей в клеточной и физико-химической биологии, а также в молекулярной медицине. Однако в конце пятидесятых годов открытие первого биологически активного соединения с сигнальными функциями – сАМР – перевернуло представления о регуляции биохимических процессов в клетке и о механизмах работы внутриклеточных

систем передачи сигнала. Оказалось, что сигнальные молекулы, не способные проходить через клеточную мембрану, взаимодействуют с расположенными на ее внешней стороне специфическими рецепторами и ферментными системами. Таким образом, при взаимодействии с мембранными рецепторными системами биологически активные соединения определяют образование в клетке одного или нескольких вторичных мессенджеров – низкомолекулярных биологически активных соединений, передающих сигнал на внутриклеточные эффекторные структуры. К настоящему времени описано более 10 подобных соединений – это циклические нуклеотиды сАМР и сGMP, продукты инозитидного обмена – инозиттрифосфат (IP3) и диацилглицерин (DAG), а также ионы Ca²⁺,

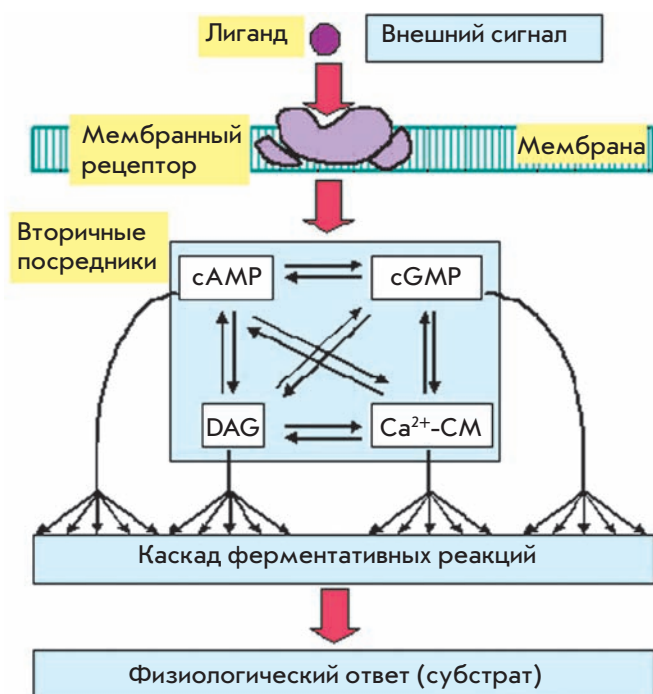


Рис. 1. Основные этапы передачи сигнала, опосредуемого вторичными посредниками, внутрь клетки.

полинуклеотид олигоА, монооксид азота (NO), продукты обмена арахидоновой кислоты и ряд других соединений липидной природы (рис. 1).

Оказалось, что ключевые этапы передачи сигнала, опосредуемого вторичными посредниками, общие для регуляторных систем: *агонист – рецептор – эффекторный белок – вторичный посредник – модулируемый белковый компонент – физиологический ответ*. Главные особенности вторичных посредников – их универсальность и триггерные свойства. При этом в роли эффекторов и их систем регуляции могут выступать как разнообразные молекулярные структуры (например, ионные каналы), так и многоступенчатые каскады ферментативных реакций.

За выдающиеся успехи в изучении данной группы биологически активных соединений во второй половине 20 века была присуждена не одна нобелевская премия. В разные годы ее лауреатами становились Э. Сазерленд, Е. Фишер и Э. Кребс, Ф. Гилман и М. Родбелл, П. Грингард, Л. Ингарро, Р. Фурчготт, Ф. Мурад и другие ученые. Необходимо отметить, что все основные достижения молекулярной физиологии так или иначе связаны с изучением рецепторов клеточной поверхности. Значительный вклад в понимание физиологии клетки был внесен благодаря изучению на молекулярном уровне нейронов голов-

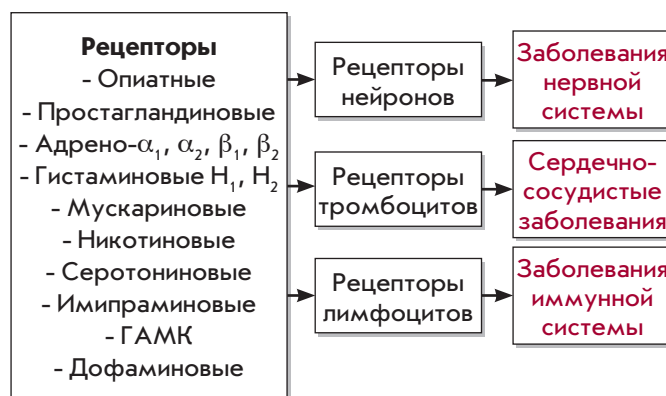


Рис. 2. Влияние рецепторного портрета клеток на особенности системных патологий (ГАМК – γ -аминомасляная кислота).

ного мозга, нейронных сетей и механизмов распространения нервного импульса.

Рецепторы клеточной мембраны подразделяют на два основных класса – ионотропные и метаболитные. Ионотропные рецепторы представляют собой мембранные каналы, открываемые или закрываемые при связывании с лигандом. Возникающие при этом ионные токи модулируют внутриклеточные концентрации ионов, что может повторно приводить к активации систем внутриклеточных посредников. Метаболитные рецепторы могут быть прямо связаны с системами вторичных посредников. Изменение конформации рецепторов данной группы при связывании с лигандом приводит к запуску каскада биохимических реакций и в конечном счете к изменению функционального состояния клетки. Рецепторы плазмалеммы играют важную роль в межклеточных коммуникациях, трансдукции сигнала внутрь клетки, проведении нервного импульса и во многих других клеточных функциях. Все многообразие рецепторов к лигандам различного типа, представленное на мембране конкретной клетки, составляет ее рецепторный портрет, детерминирующий виды физиологической активности этой клетки (рис. 2).

Следует отметить, что изучение функционирования комплекса рецепторов не только позволяет понять как «живет» нормальная клетка, но и проливает свет на молекулярные причины различных заболеваний. На уровне функционирования клеточных рецепторных систем прослеживается неразрывная связь между молекулярной физиологией и молекулярной медициной. Именно постулат П. Эрлиха об избирательном действии лекарственных препаратов на селективные мишени (1905 г.) послужил отправной точкой для развития фармакологической науки, в частности фармакодинамики, одна из основных за-

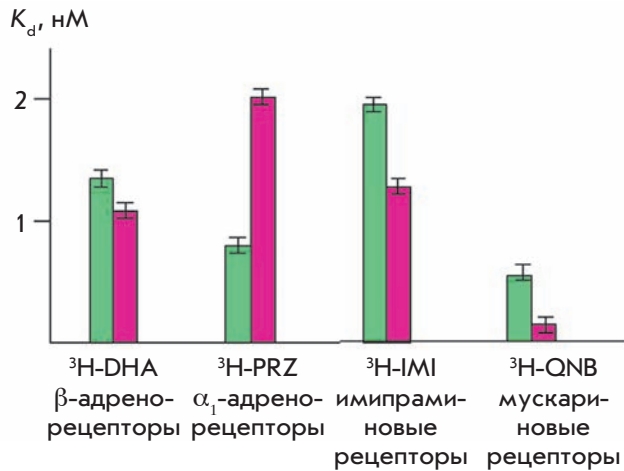


Рис. 3. Параметры связывания рецепторов альвеолярных макрофагов легких человека с лигандами в норме и при хроническом воспалении легких (^3H – тритий, DHA, PRZ, IMI, QNB – лиганды). Зеленым показаны значения K_d для лигандов в норме, малиновым – при хроническом воспалении легких.

дач которой состоит в изучении рецепторных механизмов действия лекарственных средств. Рецепторный портрет определяет не только функциональную активность нормальной клетки, но также и особенности патологических состояний самих клеток и целых органов. В последние годы подробно изучается как рецепторный портрет человека, так и его зависимость от течения патологического процесса в определенных органах-мишенях. Ранее нами были определены параметры главных рецепторных систем альвеолярных макрофагов человека в норме и при патологиях [1]. На примере величин констант диссоциации лигандов было показано, что профили физиологических параметров рецепторов существенно различаются в норме и при патологии (рис. 3).

Мы сравнили также активность ферментов системы фосфорилирования в нормальных клетках и в клетках злокачественных опухолей человека. Оказалось, что в нормальных и опухолевых клетках уровни активности ферментов значительно различаются, но при этом обнаружены общие для опухолевых клеток разного типа тенденции изменения активности исследованных киназ [2].

В целом, в настоящее время происходит лавинообразное накопление экспериментальных данных о внутриклеточной «машинерии», тонкостях молекулярных механизмов синаптической передачи, а также знаний о структуре и функциях нормальных и дефектных генов и белков.

Важность функций мембранных рецепторов и их пространственная локализация делают эти молеку-

лы главными мишенями при создании лекарственных средств против широкого круга заболеваний, включая онкологические. Одним из ярких достижений молекулярной физиологии последних лет стало создание препаратов направленного действия на основе «терапевтических» моноклональных антител. Так, например, трастузумаб, созданный на основе гуманизированных моноклональных антител к рецептору ErbB2 (HER2, HER2/neu) из семейства рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) широко используется при таких злокачественных заболеваниях, как, например, рак молочной железы. Гуманизированные моноклональные антитела, специфично связывающиеся с внеклеточной частью молекулы рецептора HER2/neu, препятствуют неконтролируемой пролиферации клеток, вызывая остановку клеточного цикла и подавляя ангиогенез. Кроме того, при связывании моноклонального антитела с клеткой-мишенью наблюдаются активация клеточного иммунитета и выраженная антителозависимая цитотоксичность.

Применение молекулярного подхода, в данном случае использование таргетных препаратов на основе моноклональных антител, способно значительно улучшить клиническую картину, а также повысить качество жизни больного и увеличить ее продолжительность. Разработка терапевтических средств направленного действия, способных избирательно взаимодействовать с мишенями внутри или на поверхности клетки, составляет одно из приоритетных направлений молекулярной медицины вследствие уникальности рецепторного портрета каждого типа клеток. Перспективность этого направления обусловлена тем, что нарушения активности различных ферментов или их регуляции лежат в основе многих метаболических расстройств и заболеваний, поскольку ферменты участвуют практически во всех биохимических реакциях и зачастую определяют течение патологических процессов.

Мембраносвязанные ферменты обладают широким спектром биологической активности, принимают участие в важнейших процессах – процессинге биологически активных молекул, деградации компонентов внеклеточного матрикса, расщеплении или активации растворимых или поверхностных белков, адгезии клеток, передаче сигналов внутрь клетки. Так, с активностью различных протеаз, особенно локализованных на мембране, связывают события, происходящие на ранних стадиях опухолевого процесса вследствие нарушения регуляции экспрессии и активности ферментов этого класса [3–6]. Нами получены веские доказательства важности такого подхода при исследовании маркеров рака предстательной железы (РПЖ).

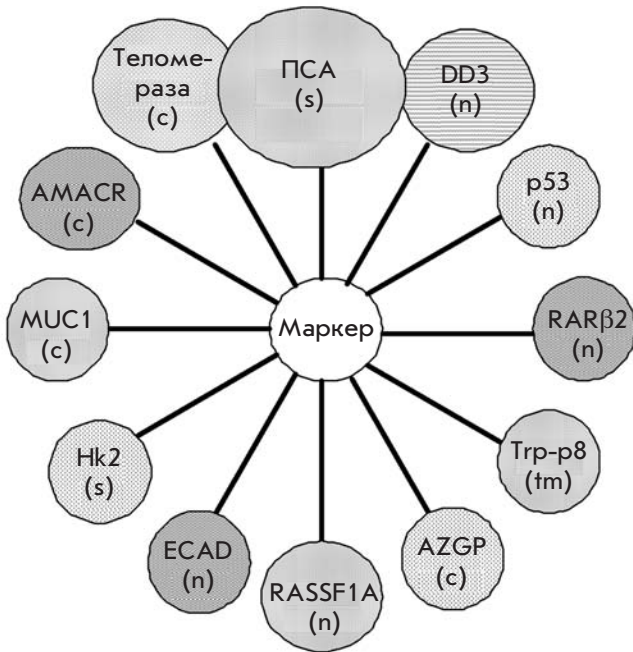


Рис. 4. Некоторые маркеры рака предстательной железы и их локализация в клетке (ПСА – простатспецифический антиген, DD3 – differential display code 3, p53 – protein 53, RAR β 2 – retinoic acid receptor beta 2, Trp-p8 – transient receptor potential-p8, AZGP – цинк- α -2-гликопротеин 1, RASSF1A – RAS association domain family protein 1A, ECAD – E-cadherin, Hk2 – human prostate specific glandular kallikrein, MUC1 – муцин 1, AMACR – α -methylacyl-coenzyme A racemase, n – ядерные, c – цитоплазматические, s – растворимые, tm – трансмембранные).

Рак предстательной железы – одно из наиболее широко распространенных у мужчин злокачественных новообразований, которое характеризуется быстрым метастазированием [7]. Ежегодно в странах Евросоюза выявляют 200 000 новых случаев РПЖ и около 40 000 мужчин от него умирают [8]. Здесь мы вплотную приближаемся к еще одному аспекту взаимодействия молекулярной физиологии и медицины – молекулярной диагностике заболеваний.

На сегодняшний день выявлено большое число генов и их продуктов, потенциально вовлеченных в развитие РПЖ и способных в той или иной степени считаться маркерами этого заболевания [9–14]. Изменения ткани предстательной железы в процессе малигнизации затрагивают все основные клеточные функции и находят отражение на различных уровнях структур и процессов, таких, как цитоморфологические изменения, изменения в уровне экспрессии генов и их продуктов, эпигенетические изменения и другие. Основные молекулярные маркеры, свиде-

тельствующие о малигнизации ткани предстательной железы, представлены на рис. 4.

При злокачественных новообразованиях предстательной железы, включая РПЖ, одно из наиболее значимых событий – изменение генетического материала, в частности изменение профиля метилирования ДНК [15–24]. Наблюдается гиперметилирование 5'-регуляторных областей ряда генов, приводящее к их инактивации. Эти изменения генетического материала можно использовать для диагностики разных патологических состояний ткани предстательной железы.

К хорошо известным эпигенетическим аномалиям относится изменение профиля метилирования промоторной области гена *GST π 1* в опухолевых клетках. Этот ген кодирует цитоплазматическую глутатион-S-трансферазу класса π 1 (*GST π 1*), участвующую в регуляции апоптоза и утилизации ксенобиотиков. Так, в нормальных клетках предстательной железы промоторная область гена *GST π 1* неметилирована, при пролиферативной воспалительной атрофии частота метилирования этой области *GST π 1* составляет 6.4%, при высокоактивной интраэпителиальной неоплазии (ПИН) – 70%, а при аденокарциноме предстательной железы – 90% [25].

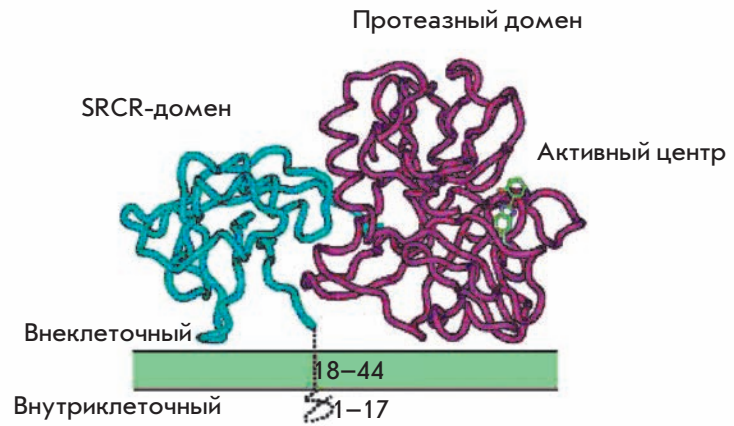
Изменения статуса метилирования 5'-регуляторных областей затрагивают не только ген *GST π 1*, но и гены, продукты которых участвуют в подавлении опухолевого роста [26–32]. Метилирование CGI в промоторных областях таких генов приводит к инактивации этих генов, что связано с повышением риска возникновения злокачественных заболеваний. Ген *RAR β 2* (retinoic acid receptor beta 2) кодирует белок, отвечающий за рецептор-опосредованную супрессию опухолевого роста (как известно, ретиноиды являются ингибиторами роста и развития опухолей). Метилирование CpG-островков в промоторной области гена *RAR β 2* свидетельствует о малигнизации ткани предстательной железы. В здоровой ткани поджелудочной железы метилирование CpG-островков не обнаруживается [33]. Ген *RASSF1A* (RAS association domain family protein 1A) также является супрессором опухолевого роста. Метилирование CpG-островков в промоторной области этого гена отмечено при малигнизации различных типов тканей [34, 35]. Частота и степень метилирования *RASSF1A* коррелируют с агрессивностью опухоли, что позволяет прогнозировать течение заболевания [36].

Целый ряд проведенных ранее исследований свидетельствует о ключевой роли повреждений молекул ДНК в развитии опухолевого процесса. Среди этих повреждений одним из наиболее значимых считается возникновение большого числа хромосомных перестроек и мутаций в тканях опухоли. Нестабиль-

Рис. 5. а – Гистохимическое окрашивание срезов ткани предстательной железы моноклональными антителами к хепсину (интенсивность окраски коррелирует с уровнем экспрессии хепсина на поверхности клеток). Образцы тканей получены от больных с заболеваниями предстательной железы различной степени тяжести. **б** – Доменная структура хепсина и расположение белка относительно клеточной мембраны (зеленым показаны плазмалемма и активный центр, голубым – SRCR-домен, фиолетовым – протеазный домен).



а



б

ность генома – это общее свойство опухолевых клеток, которое проявляется на уровне как хромосом, так и отдельных генов. При этом каждый тип опухоли характеризуется определенным набором наиболее распространенных нарушений. В ткани опухоли обнаруживается большое число структурных перестроек, прежде всего транслокаций и делеций, количество которых значительно возрастает по мере прогрессии опухоли.

В опухолевых клетках сильно повышено содержание транскриптов, состоящих из участков 5'-нетранслируемой области андроген-регулируемого гена *TMPRSS2* и экзонов генов семейства *ETC* (*ERG4* или *ETV1*) [37]. В клетках опухолей предстательной железы происходят перестройки, затрагивающие ген *TMPRSS2* и гены факторов транскрипции *ETC* (*ERG4*, *ETV1*, *ETV4* и др.). В результате этих перестроек образуются химерные онкогены [38, 39]. Андроген-зависимые промоторные элементы обеспечивают высокий уровень экспрессии таких химерных онкогенов [38, 39].

Необходимо отметить положительную корреляцию между наличием транскрипта химерного гена *TMPRSS2-ETC* и агрессивностью заболевания. Высокой частотой встречаемости при аденокарциноме предстательной железы – (от 50 до 60%) характеризуется также мРНК этого химерного гена, в то время как при ПИН эта величина составляет 16%, а в нормальной ткани – 4%.

На ранних стадиях заболевания (при локализованном опухолевом процессе) РПЖ относительно хорошо поддается лечению, однако в силу недостатков

методов диагностики опухоли зачастую обнаруживают уже на терминальных стадиях. Применяемые методы недостаточно информативны или же травматичны. Последние научные публикации указывают на определенную потерю прогностической значимости основного используемого в настоящее время биохимического теста на РПЖ – ПСА (определение концентрации простатспецифического антигена в крови больных). В медицинской практике часты случаи ложноположительных и ложноотрицательных диагнозов, поставленных на основании определения ПСА. Предварительный диагноз подтверждают при помощи биопсии, весьма болезненной процедуры с негативными для общего состояния железы последствиями. Таким образом, основная задача диагностики состоит не в установлении самого факта заболевания, а в обнаружении его на возможно более ранней стадии и в определении стадии опухолевой прогрессии.

В настоящее время описано большое количество биохимических маркеров РПЖ, источником которых служат сыворотка крови, моча, семенная жидкость и ткани предстательной железы. Лишь немногие из этих маркеров потенциально могут применяться в клинической практике, и лишь единицы из них дошли до фазы клинических испытаний. К наиболее перспективным относятся маркеры *GSTP1*, *DD3*, *AMACR*, *EPCA* и хепсин. Как уже сказано, уровень экспрессии хепсина, ограниченный в нормальных клетках, резко возрастает при развитии опухоли. Следует отметить, что специфичность повышенной экспрессии хепсина клетками опухоли предстатель-

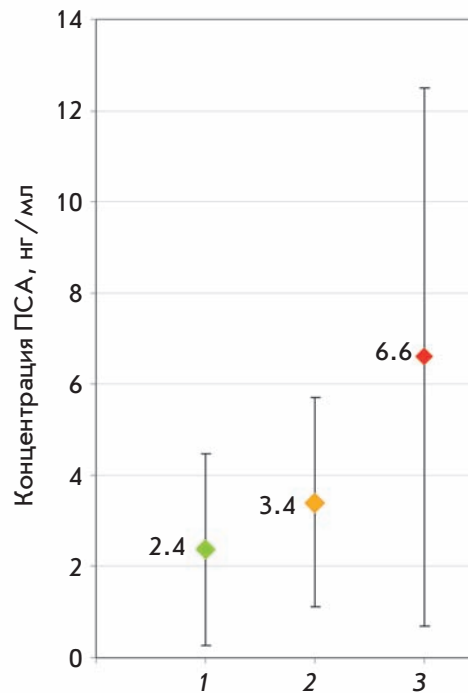
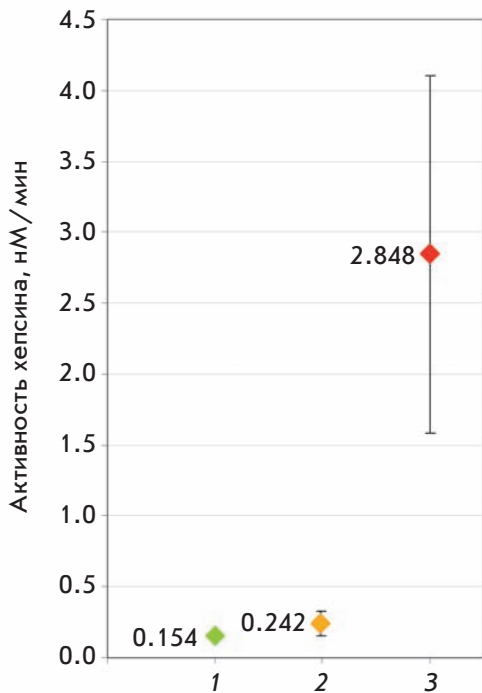


Рис. 6. Сравнительный анализ методов диагностики заболеваний предстательной железы при помощи определения концентрации ПСА в крови больного и определения активности хепсина при помощи системы «ФОТО-ХЕПСИН». Показаны средние значения показателей в экспериментальных группах и разброс значений. 1 – Группа здоровых доноров; 2 – группа больных ДГПЖ; 3 – группа больных РПЖ. Зеленый – здоровые доноры, желтый – хронический простатит и аденома предстательной железы, красный – рак предстательной железы.

ной железы привлекла внимание на самых ранних этапах изучения этого белка. Экспрессия этого фермента возрастает по мере развития опухолевого процесса, достигая максимума на его терминальных стадиях (рис. 5) [40].

Таким образом, благодаря высокой специфичности экспрессии хепсина в опухолевых клетках появляется возможность ответить на вопрос о доброкачественной или злокачественной природе новообразований в предстательной железе. По ряду параметров хепсин более предпочтителен, чем используемые сегодня в клинической практике молекулярные маркеры. Нами выдвинута гипотеза о том, что повышение протеолитической активности хепсина на поверхности клеток специфично именно для опухолей предстательной железы. Для подтверждения этой гипотезы мы получили штамм-продуцент рекомбинантного хепсина, отработали условия очистки и активации белка, нашли наиболее специфичный для него субстрат [41]. Мы доказали возможность определения протеолитической активности хепсина в образцах биоматериала, полученного от мужчин с различными патологиями предстательной железы, подобрали условия проведения такого анализа и подтвердили его специфичность в случае опухолевого процесса. Полученные данные свидетельствуют, что протеолитическая активность в группе условно здоровых доноров сходна с активностью в группе больных хроническим простатитом и ДГПЖ, однако достоверно

отличается от протеолитической активности в группе больных аденокарциномой предстательной железы (рис. 6).

Это подтверждает высокую специфичность метода – при хроническом простатите и ДГПЖ фоновый уровень протеолитической активности не изменяется и остается таким же, как у условно здоровых доноров, однако при развитии РПЖ уровень протеолитической активности резко возрастает, причем основной вклад в это повышение вносит именно хепсин, поскольку для его определения используется специфический субстрат [42].

На основе проведенных исследований в нашей лаборатории создана тест-система для диагностики РПЖ, основанная на определении активности хепсина в эпителиальных клетках предстательной железы, полученных с мочой после проведения ректального массажа (патент «Тест-система для диагностики рака предстательной железы и способ диагностики рака предстательной железы» [Евразийский патент № 011694], диагностический набор (Reg. № ФСР 2009/05065)). По таким показателям, как чувствительность, специфичность, прогностическая значимость положительного и отрицательного результатов, диагностическая точность разработанного метода не уступает известным биохимическим тестам на РПЖ, а также разрабатываемым методам, а по некоторым параметрам превосходит их (рис. 7).

Кроме того, новый метод имеет существенные преимущества перед распространенным на сегодняшний день методом определения концентрации ПСА.

Предложенный нами метод диагностики выгодно отличается от существующих неинвазивным способом забора биоматериала, так как активность фермента определяется в моче. Сделан вывод о том, что применение разработанного нами метода совместно с уже известными поможет избежать случаев постановки ложного диагноза, что положительно отразится на общем состоянии и качестве жизни больных.

Полученные нами результаты позволяют сделать вывод, что новый метод диагностики злокачественных новообразований предстательной железы с помощью определения активности хепсина имеет ряд преимуществ перед распространенным на сегодняшний день методом определения концентрации ПСА и может быть рекомендован для проведения скрининговых исследований на РПЖ в условиях клинических лабораторий.

Увеличение размера опухоли в результате усиленной неконтролируемой пролиферации опухолевых клеток приводит к их инвазии в окружающие ткани. Этот процесс сопровождается разрушением контактов как между опухолевыми, так и между нормальными клетками, а в результате действия различных трансмембранных протеаз он затрагивает и окружающий внеклеточный матрикс.

Одним из ферментов, регулирующих процесс локальной инвазии опухолевых клеток, и является сериновая протеаза хепсин [4]. Показано, что на поверхности клеток аденокарциномы предстательной железы значительно увеличивается уровень экспрессии хепсина [43–47]. Показано, что хепсин служит ключевым фактором активации протеолитических процессов в опухоли ткани, которые приводят к распространению опухолевых клеток. Для понимания предполагаемой роли хепсина в этих процессах рассмотрим подробнее участие мембраносвязанных протеолитических ферментов в прогрессии опухоли. В ходе развития патологии активность протеаз, локализованных на внешней стороне клеточной мембраны, приводит к неконтролируемому протеолизу компонентов внеклеточного матрикса и дезорганизации его структуры. Поскольку значительная часть работ, направленных на изучение роли хепсина в развитии онкопатологии, затрагивает опухоли предстательной железы, рассмотрим нарушение структуры базальной мембраны этого органа с позиции молекулярной физиологии и возможной роли хепсина.

Базальная мембрана предстательной железы – это специализированная внеклеточная структура, отделяющая эпителиальные и стромальные клетки друг

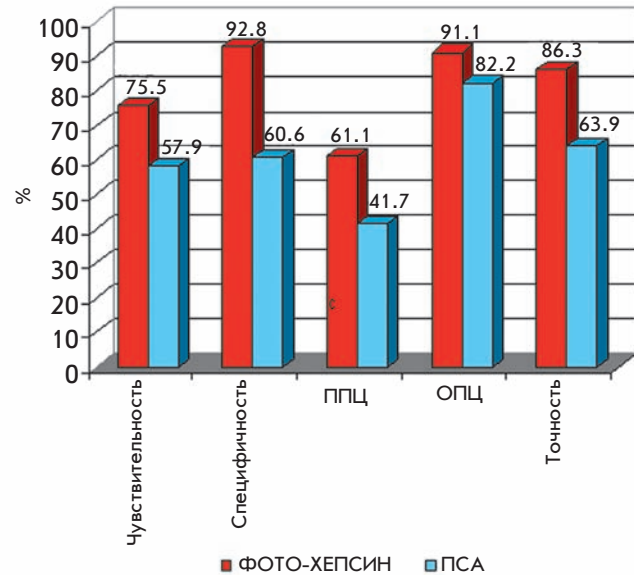


Рис. 7. Сравнительный анализ основных характеристик методов диагностики заболеваний предстательной железы – определения концентрации ПСА в крови и определения активности хепсина при помощи системы «ФОТО-ХЕПСИН». Красный – значения параметров системы «ФОТО-ХЕПСИН», синий – значения параметров метода определения концентрации ПСА, ОПЦ – отрицательная прогностическая ценность, ППЦ – положительная прогностическая ценность.

от друга и состоящая из матриксных белков, продуцируемых этими двумя типами клеток [48]. Потеря этой структуры необходима для локальной инвазии в ходе раннего метастатического процесса [49]. В настоящее время становятся ясными возможные молекулярные механизмы, вовлекающие хепсин в развитие злокачественных опухолей. Так, обнаружен ряд компонентов внеклеточного матрикса, потенциальных субстратов хепсина [4, 50].

Другой аспект вклада хепсина в развитие патологии – активация неактивных форм ферментов, также вовлеченных в процессы деградации базальной мембраны [51]. Таким образом, при участии хепсина может происходить многократное усиление протеолитических процессов на поверхности опухолевых и стромальных клеток, усугубляющее повреждение базальной мембраны и прогрессию опухоли (рис. 8).

Эту гипотезу подтверждают также данные о подавлении инвазивного роста опухолевых клеток при ингибировании протеолитической активности хепсина [52]. Эта и другие особенности хепсина делают его удобной мишенью для терапевтического воздействия. Поэтому изучение механизмов ингибиро-

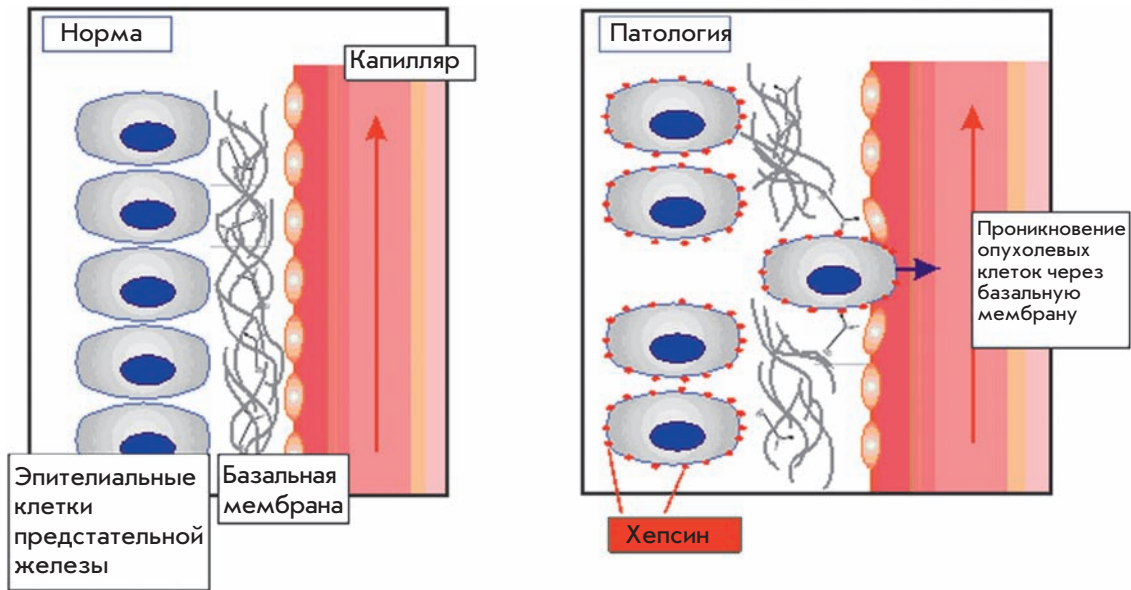


Рис. 8. Инвазия опухолевых клеток через базальную мембрану при участии хепсина.

вания представляется перспективным направлением разработки противоопухолевых препаратов, эффективных в случае опухолей, для которых характерна повышенная экспрессия хепсина. В настоящее время активно ведется поиск специфических ингибиторов хепсина с целью создания препаратов направленного действия и разработки методов терапии РПЖ [53]. Хепсин вовлечен в такие события, как увеличение подвижности клеток, расщепление матриксных белков и дезорганизация внеклеточных структур, активация внеклеточных протеаз и их каскадов, лежащих в основе механизмов прогрессии опухоли. Ингибирование активности этого фермента может приводить к подавлению всех этих процессов, что будет положительно сказываться на течении заболевания.

В 2008 г. в результате скрининга библиотек лекарственных препаратов и разнообразных химических соединений, проведенного с целью поиска потенциальных низкомолекулярных ингибиторов хепсина, обнаружили ряд соединений, способных специфически ингибировать его протеолитическую активность. Одним из наиболее эффективных ингибиторов хепсина оказался антралин (1,8,9-антрацентриол). Нами показано, что некоторые соединения дозозависимо подавляют активность рекомбинантного хепсина, не проявляя цитотоксического эффекта в отношении различных клеточных линий, что немаловажно для терапевтического применения. Среди всех соединений наибольшей ингибирующей способностью в отношении хепсина обладал антралин: он ингибировал хепсин в 5.5 раза эффективнее, чем трипсин, и в 85 раз эффективнее, чем тромбин [53].

Ранее в нашей лаборатории мы обнаружили, что антралин ингибирует рекомбинантный хепсин,

поэтому предположили, что подобным же образом антралин влияет и на нативную форму белка [41]. Основной вклад в протеолитическую активность на поверхности клеток аденокарциномы предстательной железы вносит хепсин, поскольку гиперэкспрессируется именно его ген, поэтому можно предположить, что воздействие специфичного ингибитора хепсина значительно снизит общую протеолитическую активность. Добавление антралина к лизированным клеткам аденокарциномы предстательной железы человека приводило к 50–70% падению общей протеолитической активности, что свидетельствует об эффективности ингибирующего действия антралина по отношению к нативному хепсину, локализованному на мембранах опухолевых клеток. На рис. 9 приведены результаты определения протеолитической активности в линии клеток LnCap аденокарциномы предстательной железы человека в отсутствие и в присутствии антралина.

Воздействие на указанные ферментативные системы способно скорректировать наблюдаемые нарушения, а мембранная локализация ряда ферментов чрезвычайно удобна для разработки лекарственных средств направленного действия и их применения. Воздействие на активность ферментов часто лежит в основе подходов, применяемых при различных заболеваниях и создании новых лекарственных средств. Учитывая широкое распространение сериновых протеаз и их участие в развитии патологических состояний, важное значение имеет поиск их ингибиторов. Уже в настоящее время ряд соединений, способных подавлять активность протеаз, применяется в терапии опухолей. Опубликованы данные о повышенной экспрессии некоторых членов семейства трансмем-



Рис. 9. Сравнительная протеолитическая активность живых и лизированных клеток линии LpCar в отсутствие и в присутствии антралина (фиолетовый – лизированные клетки, зеленый – монослой живых клеток).

бренных сериновых протеаз при различных онкопатологиях. Ингибирование активности ферментов данного семейства представляется перспективным направлением противоопухолевой терапии.

Трансмембранная локализация хепсина делает его хорошей мишенью для терапевтических агентов, поскольку расположение протеазного домена этого белка на поверхности клеток может облегчить их доставку. Еще одно преимущество хепсина как молекулярной мишени состоит в том, что негативные эффекты от подавления активности хепсина будут, по-видимому, минимальными, а высокая специфичность его экспрессии клетками опухолевой ткани можно использовать для эффективной и специфичной противоопухолевой терапии.

В представленной статье мы попытались обобщить основные черты молекулярной физиологии как новой междисциплинарной области фундаментальных знаний о работе сложных биологических систем. Молекулярная физиология занимает особое место в палитре современных наук о живом. Это обусловлено, во-первых, ее связью с медициной и колоссальными практическими приложениями, а во-вторых, с концептуальной революцией, происходящей в фундаментальной медицине последние 10–15 лет. Эти факторы позволяют говорить о молекулярной физиологии как о общебиологической дисциплине, находящейся на стыке таких наук, как генетика, биохимия, биоорганическая химия, молекулярная и клеточная биология, микробиология, эволюционная биология. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kondratenko T.Y., Zacharova I.V., Kuzina N.V., Katukov V.Yu., Severin E.S., Kornilova Z.Ch., Perelman M.I. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993. V. 29. № 1. P. 123–130.
- Петухов С.П., Чибалин А.В., Коваленко М.В., Буларгина Т.В., Северин Е.С. // *Биохимия.* 1991. Т. 56. № 11. С. 2077–2096.
- Chang C., Werb Z. // *Trends Cell. Biol.* 2001. V. 11. P. 37–43.
- Klezovitch O., Chevillet J., Mirosevich J., Roberts R.L., Matusik R.J., Vasioukhin V. // *Cancer Cell.* 2004. V. 6. P. 185–195.
- Andreasen P.A., Kjoller L., Christensen L., Duffy M.J. // *Int. J. Cancer.* 1997. V. 72. P. 1–22.
- Dano K., Behrendt N., Hoyer-Hansen G., Johnsen M., Lund L.R., Ploug M., Romer J. // *Thromb. Haemost.* 2005. V. 93. P. 676–681.
- Давыдов М.И., Аксель Е.М. // *Вест. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.* 2008. Т. 19. № 2. Прил. 1. 154 с.
- Васильева Е.Б., Савватеева М.В., Кузнецова Е.М., Северин С.Е., Фиев Д.Н., Аляев Ю.Г., Винаров А.З. // *Онкоурология.* 2008. № 3. С. 50–53.
- Yu Y.P., Landsittel D., Jing L., Nelson J., Ren B., Liu L., McDonald C., Thomas R., Dhir R., Finkelstein S., Michalopoulos G., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2004. V. 22. № 14. P. 2790–2799.
- Popa I., Fradet Y., Beaudry G., Hovington H., Beaudry G., Tetu B. // *Modern Pathol.* 2007. V. 20. № 11. P. 1121–1127.
- Furusato B., Gao C.L., Ravindranath L., Chen Y., Cullen J., McLeod D.G., Dobi A., Srivastava S., Retrovics G., Sesterhenn I.A. // *Modern Pathol.* 2008. V. 21. № 2. P. 67–75.
- Santinelli A., Mazzucchelli R., Barbisan F., Lopez-Beltran A., Cheng L., Scarpelli M., Montironi R. // *Am. J. Clin. Pathol.* 2007. V. 128. № 4. P. 657–666.
- Ananthanarayanan V., Deaton R.J., Yang X.J., Pins M.R., Gann P.H. // *Prostate.* 2005. V. 63. № 4. P. 341–346.
- Uetsuki H., Tsunemori H., Taoka R., Haba R., Ishikawa M., Kakehi Y. // *J. Urol.* 2005. V. 174. № 2. P. 514–518.
- Baylin S.B., Herman J.G., Graff J.R., Vertino P.M., Issa J.P. // *Adv. Cancer Res.* 1998. V. 72. P. 141–196.
- Bird A. // *Cell.* 1992. V. 70. P. 5–8.
- Merlo A., Herman J.G., Mao L., Lee D.J., Gabrielson E., Burger P.C., Baylin S.B., Sidransky D. // *Nat. Med.* 1995. V. 1. P. 686–692.
- Herman J.G., Umar A., Polyak K., Graff J.R., Ahuja N., Issa J.P., Markowitz S., Willson J.K., Hamilton S.R., Kinzler K.W., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 12. P. 6870–6875.
- Hoque M.O., Topaloglu O., Begum S., Henrique R., Rosenbaum E., van Criekinge W., Westra W.H., Sidransky D. // *J. Clin. Oncol.* 2005. V. 23. № 27. P. 6569–6575.
- Cooper C.S., Foster C.S. // *Br. J. Cancer.* 2009. V. 100. № 2. P. 240–245.
- Nelson W.G., Yegnasubramanian S., Agoston A.T., Bastian

- P.J., Lee B.H., Nakayama M., De Marzo A.M. // *Front. Biosci.* 2007. V. 12. P. 4254–4266.
22. Dobosy J.R., Roberts J.L., Fu V.X., Jarrard D.F. // *J. Urol.* 2007. V. 177. № 3. P. 822–831.
23. Li L.C. // *Front. Biosci.* 2007. V. 12. P. 3377–3397.
24. Esteller M. // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. № 4. P. 286–298.
25. Nakayama M., Bennett C.J., Hicks J.L., Epstein J.I., Platz E.A., Nelson W.G., De Marzo A.M. // *Am. J. Pathol.* 2003. V. 163. № 3. P. 923–933.
26. Henrique R., Costa V.L., Cerveira N., Carvalho A.L., Hoque M.O., Ribeiro F.R., Oliveira J., Teixeira M.R., Sidransky D., Jeronimo C. // *J. Mol. Med.* 2006. V. 84. № 11. P. 911–918.
27. Henrique R., Jeronimo C., Hoque M.O., Carvalho A.L., Oliveira J., Teixeira M.R., Lopes C., Sidransky D. // *DNA Cell Biol.* 2005. V. 24. № 4. P. 264–269.
28. Henrique R., Jeronimo C., Hoque M.O., Nomoto S., Carvalho A.L., Costa V.L., Oliveira J., Teixeira M.R., Lopes C., Sidransky D. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005. V. 14. № 5. P. 1274–1278.
29. Henrique R., Jeronimo C., Teixeira M.R., Hoque M.O., Carvalho A.L., Pais I., Ribeiro F.R., Oliveira J., Lopes C., Sidransky D. // *Mol. Cancer Res.* 2006. V. 4. № 1. P. 1–8.
30. Henrique R., Ribeiro F.R., Fonseca D., Hoque M.O., Carvalho A.L., Costa V.L., Pinto M., Oliveira J., Teixeira M.R., Sidransky D., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13. № 20. P. 6122–6129.
31. Henrique R., Ribeiro F.R., Fonseca D., Hoque M.O., Carvalho A.L., Costa V.L., Pinto M., Oliveira J., Teixeira M.R., Sidransky D., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 10. P. 8472–8478.
32. Jeronimo C., Usadel H., Henrique R., Silva C., Oliveira J., Lopes C., Sidransky D. // *Urology.* 2002. V. 60. № 6. P. 1131–1135.
33. Meyer H.A., Ahrens-Fath I., Sommer A., Haendler B. // *Biomed. Pharmacother.* 2004. V. 58. P. 10–16.
34. Aitchison A., Warren A., Neal D., Rabbitts P. // *Prostate.* 2007. V. 67. № 6. P. 638–644.
35. Krop I., Player A., Tablante A., Taylor-Parker M., Lahti-Domenici J., Fukuoka J., Batra S.K., Papadopoulos N., Richards W.G., Sugarbaker D.J., et al. // *Mol. Cancer Res.* 2004. V. 2. № 9. P. 489–494.
36. Liu L., Yoon J.H., Dammann R., Pfeifer G.P. // *Oncogene.* 2002. V. 21. № 44. P. 6835–6840.
37. Tomlins S.A., Rhodes D.R., Perner S., Dhanasekaran S.M., Mehra R., Sun X.W., Varambally S., Cao X., Tchinda J., Kuefer R., et al. // *Science.* 2005. V. 310. P. 644–648.
38. Tomlins S.A., Rubin M.A., Chinnaiyan A.M. // *Annu. Rev. Pathol.* 2006. V. 1. P. 243–271.
39. Perner S., Mosquera J.M., Demichelis F., Hofer M.D., Paris P.L., Simko J., Collons C., Bismar T.A., Chinnaiyan A.M., De Marzo A.M., et al. // *Am. J. Surg. Pathol.* 2007. V. 31. P. 882–888.
40. Xuan J.A., Schneider D., Toy P., Newton A., Zhu Y., Finster S., Vogel D., Mintzer B., Dinter H., et al. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 3611–3619.
41. Raevskaya A.A., Kuznetsova E.M., Savvateeva M.V., Severin S.E. // *Biochemistry (Mosc).* 2010. V. 75. P. 866–872.
42. Васильева Е.Б., Савватеева М.В., Кузнецова Е.М., Северин С.Е., Северин Е.С., Фиев Д.Н., Алясов Ю.Г., Винаров А.З. // *Андрология и генитальная хирургия.* 2008. № 3. С. 46–49.
43. Dhanasekaran S.M., Barrette T.R., Ghosh D., Shah R., Varambally S., Kurachi K., Pienta K.J., Rubin M.A., Chinnaiyan A.M. // *Nature.* 2001. V. 412. P. 822–826.
44. Luo J., Duggan D.J., Chen Y., Sauvageot J., Ewing C.M., Bittner M.L., Trent J.M., Isaacs W.B. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 4683–4688.
45. Magee J.A., Araki T., Patil S., Ehrig T., True L., Humphtey P.A., Catalona W.J., Watson M.A., Milbrandt J. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 5692–5696.
46. Chen Z., Fan Z., McNeal J.E., Nolley R., Caldwell M.C., Mahadevappa M., Zhang Z., Warrington J.A., Stamey T.A. // *J. Urol.* 2003. V. 169. P. 1316–1319.
47. Yamaguchi N., Okui A., Yamada T., Nakazato H., Mitsui S. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 6806–6812.
48. Nagle R.B., Hao J., Knox J.D., Dalkin B.L., Clark V., Cress A.E. // *Am. J. Pathol.* 1995. V. 146. P. 1498–1507.
49. Robinson V.L., Kauffman E.C., Sokoloff M.H., Rinker-Schaeffer C.W. // *Cancer Treat. Res.* 2004. V. 118. P. 1–21.
50. Tripathi M., Nandana S., Yamashita H., Ganasan R., Kirchofer D., Quaranta V. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 30576–30584.
51. Moran P., Li W., Fan B., Vij R., Eigenbrot C., Kirchofer D. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 30439–30446.
52. Miyata S., Fukushima T., Kohama K., Tanaka H., Takeshima H., Kataoka H. // *Hum. Cell.* 2007. V. 20. P. 100–106.
53. Chevillet J.R., Park G.J., Bedalov A., Simon J.A., Vasioukhin V.I. // *Mol. Cancer Ther.* 2008. V. 7. P. 3343–3351.

УДК 535.37:577.336/616-006

Квантовые точки для молекулярной диагностики опухолей

Т. А. Здобнова*, Е. Н. Лебедеенко, С. М. Деев

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

*E-mail: t.zdobnova@mail.ru

Поступила в редакцию 15.10.2010 г.

РЕФЕРАТ Квантовые точки – это относительно новый класс флуорофоров с уникальными физико-химическими свойствами, которые позволяют существенно расширить возможности современных методов флуоресцентной визуализации и оптической диагностики. В обзоре рассмотрены перспективы применения квантовых точек для молекулярной диагностики опухолей от определения онкомаркеров на микропланшетах до неинвазивной визуализации новообразований *in vivo*, обозначены проблемы, которые необходимо решить для внедрения квантовых точек в клиническую практику, и намечены инновационные подходы в онкологии, осуществимые с применением квантовых точек.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА квантовые точки, флуоресцентная визуализация, многоцветное мечение, наночастицы. **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АФК – активные формы кислорода; ИГХ – иммуногистохимический анализ; ИФА – иммуноферментный анализ; КТ – квантовые точки; МУК – меркаптоуксусная кислота; ПЭГ – полиэтиленгликоль; РЭС – ретикулоэндотелиальная система; AFP – альфафетопротеин; EGF – эпидермальный фактор роста; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; HER2/neu – человеческий эпидермальный рецептор 2/neu; IGF1R – рецептор инсулин-подобного фактора роста типа 1; PSCA – простатический антиген стволовых клеток; PSMA – простатоспецифический мембранный антиген; scFv – одноцепочечный варибельный фрагмент антитела.

ВВЕДЕНИЕ

В современных биомедицинских исследованиях большое внимание уделяется поиску новых путей неинвазивного получения изображений внутренней структуры биологических объектов. Благодаря появлению приборов с высоким пространственным разрешением все большее распространение получают оптические методы изучения, одним из наиболее наглядных и информативных среди которых является флуоресцентная диагностика очагов патологии непосредственно в организме.

Значительная часть разрабатываемых методов направлена на получение изображения новообразований, тканей и органов, исследование молекулярной структуры опухолевых клеток путем регистрации аутофлуоресценции, а также с помощью специфического окрашивания наблюдаемых объектов флуоресцентными контрастирующими агентами. Такие методы могут позволить не только обнаружить место локализации опухоли в организме, но и оценить уровень экспрессии различных белков и активность отдельных клеток и процессов, которые влияют на поведение опухоли и ее ответ на действие терапевтических агентов.

К контрастирующим агентам, используемым в современных методах флуоресцентной диагностики, предъявляются особые требования. Флуорофоры должны иметь следующие свойства: небольшие размеры (1–10 нм); достаточную яркость и высокий квантовый выход; возбуждение и флуоресценцию в спектральном диапазоне, соответствующем наилучшему проникновению в биологические ткани; химическую устойчивость и фотостабильность, биосовместимость (устойчивость в биологических средах, отсутствие токсичности). Кроме того, для биологических исследований часто необходима конъюгация этих флуорофоров с различными направляющими молекулами для их доставки к определенным мишеням (белкам, компартментам, клеткам). Конъюгаты должны обладать специфичностью и стабильностью взаимодействия с мишенью, а также низким уровнем неспецифического связывания.

Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы, так называемые квантовые точки (КТ, *англ.* quantum dots), – относительно новый класс флуорофоров, обладающих своеобразными оптическими и физико-химическими свойствами, не харак-

терными для других флуоресцентных красителей. Традиционно для диагностики широко используются два основных класса флуорофоров: органические красители и флуоресцентные белки [1]. За время, прошедшее с начала использования этих флуорофоров в биологии и медицине, они претерпели значительную эволюцию, и к настоящему времени создан целый ряд органических красителей с небольшой молекулярной массой, а также флуоресцентных белков с высокой яркостью, хорошим квантовым выходом, излучающих во всех областях спектра от синего до ближнего инфракрасного (ИК) [2, 3]. Однако некоторые свойства этих флуорофоров, в особенности широкий спектр флуоресценции и низкая устойчивость к фотовыцветанию, до сих пор ограничивают их эффективность в таких видах исследований, как, например, долговременная визуализация и одновременная детекция множества сигналов без использования дополнительного комплекса инструментов и способов обработки [4].

КТ обладают целым рядом физико-химических особенностей, которые дают более широкие возможности по сравнению с традиционно используемыми флуоресцентными метками и делают их особенно привлекательными для использования в самых разнообразных биологических экспериментах [5, 6].

Этот обзор посвящен рассмотрению возможностей применения КТ для изучения молекулярных механизмов процессов, происходящих в опухолевых клетках, а также для диагностики опухолей как *in vitro*, так и *in vivo*.

1. ОСОБЕННОСТИ КТ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ПРЕИМУЩЕСТВА ПРИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Квантовые точки – это почти сферические нанокристаллы размером 1–10 нм, состоящие из небольшого числа атомов (500–10 000) полупроводниковых материалов II–VI (например, CdSe, CdTe, CdS и ZnSe) или III–V (например, InP и InAs) групп Периодической таблицы Д.И. Менделеева. Термин «точка» характеризует главным образом чрезвычайно малые размеры этих объектов, а прилагательное «квантовый» отражает тот факт, что их поведение и свойства в значительной степени описываются не классической, а квантовой механикой. Уменьшение размера частиц вещества до размера, меньшего, чем боровский радиус экситона (например, для сферических частиц CdSe это диаметр менее 6 нм), приводит к тому, что свойства вещества начинают определяться не только и не столько его химическим составом, сколько размером. Благодаря этому полупроводниковые нанокристаллы обладают уникальными оптическими характеристиками и физико-химическими

свойствами, выгодно отличающими их от других флуорофоров, традиционно используемых в биологических исследованиях [7].

КТ обладают высоким коэффициентом молярной экстинкции (в 10–100 раз больше, чем у органических красителей) и высоким квантовым выходом (до 90%), что обеспечивает исключительную яркость этих флуорофоров. Для КТ характерен широкий спектр поглощения, значительный Stokes shift, узкий и симметричный (без «хвоста» в красной области) спектр флуоресценции (ширина пика ~25–40 нм). При этом длина волны флуоресценции «настраивается» экспериментатором путем изменения размера ядра, что позволяет создавать из одних и тех же материалов, по одним и тем же методикам широкий набор различных КТ, флуоресцирующих в области спектра от УФ до ИК (400–2000 нм) (рис. 1). Кроме того, широкий спектр возбуждения, характерный для этих наночастиц (КТ могут быть возбуждены светом на любой длине волны, меньшей, чем длина волны их флуоресценции), позволяет возбуждать смесь различных КТ на одной длине волны, сильно удаленной (>100 нм) от длин волн их флуоресценции [9]. Такие свойства КТ значительно повышают возможности методов многоцветного мечения и одновременной идентификации различных биологических объектов по сравнению с другими красителями [6].

Высокая устойчивость к фотовыцветанию (в 100–1000 раз выше, чем у органических флуорофоров) и исключительная устойчивость к фото- и химической деградации [7, 10], характерные для флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов, позволяют использовать их в длительных экспериментах по визуализации процессов, происходящих в клетке в реальном времени, таких, как эндоцитоз [11] или перемещение отдельных рецепторных молекул на поверхности живой клетки [12], а также для окраски образцов, требующих длительного хранения [13].

Более подробное описание физико-химических свойств КТ, важных для биологического применения, а также сравнение использования КТ и других флуорофоров в биомедицинских исследованиях можно найти в обзорах [4–6].

Физико-химические и оптические свойства, а также особенности КТ напрямую зависят от метода их синтеза. Эта обширная область, которая не является предметом данного обзора, продолжает активно развиваться, расширяя ряд КТ, применимых в биомедицинских исследованиях, и улучшая их свойства (см. обзоры [4, 5]).

В настоящее время в биологии используют два типа водорастворимых монодисперсных КТ: так называемые биоинертные нанокристаллы и нанокристаллы, конъюгированные с различными биологиче-

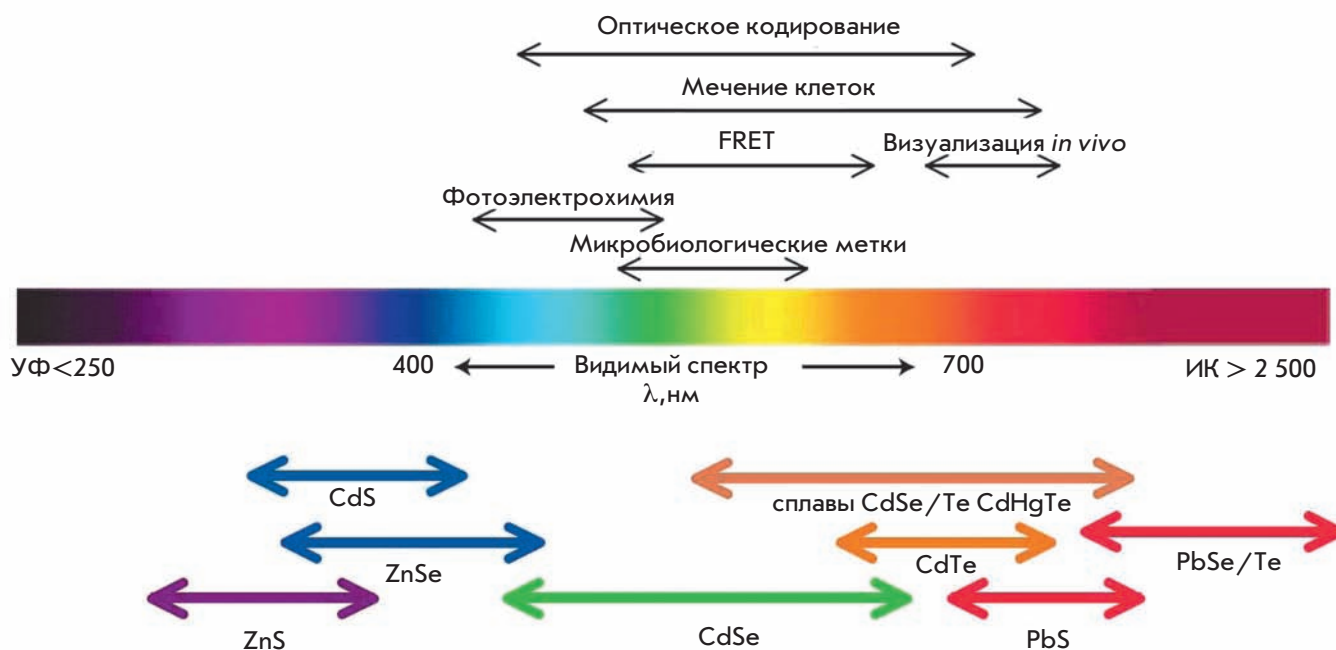


Рис. 1. Зависимость спектра флуоресценции КТ от материала ядра. Над шкалой длин волн показаны диапазоны спектра, используемые в различных биологических исследованиях. Под шкалой показаны диапазоны использования материалов ядра. Адаптировано из [8] (Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Mattoussi H. Nat. Mater. 2005 4:435–446) с разрешения Macmillan Publishers Ltd.: [Nature Materials], copyright (2005).

скими молекулами для придания им определенной специфичности.

Биоинертные КТ находят применение как неспецифические контрастирующие агенты для окрашивания клеток за счет эндоцитоза, для контрастирования кровеносных сосудов и лимфатических узлов, а также при изучении биораспределения, токсичности и пассивной доставки наночастиц в опухоли животных *in vivo*. В качестве таких частиц часто используют обычные водорастворимые КТ, модифицированные гидрофильными тиолами [14] и покрытые оболочкой из кремния [15] или из амфифильных полимеров [16]. Для уменьшения неспецифического связывания такие частицы обычно покрывают слоем инертных молекул; производители коммерческих КТ для этих целей обычно используют полиэтиленгликоль (ПЭГ).

2. НАЦЕЛИВАНИЕ КТ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

При использовании КТ в качестве флуорофоров для визуализации опухолей часто необходимо их связывание с различными направляющими молекулами, обеспечивающими селективную доставку КТ к опухолевым клеткам и их компонентам. Специфичность мечения обеспечивается выбором мишени, оптимально подходящей для каждого конкретного случая и соответствующей направляющей молекулы.

В качестве специфических мишеней для диагностики опухолей чаще всего используют рецепторную часть сигнальных белков, гиперэкспрессирующихся на мембране опухолевых клеток. Уровень экспрессии таких клеточных молекулярных онкомаркеров, определяемых непосредственно в опухолевой ткани, характеризует молекулярный профиль каждой конкретной опухоли и используется для определения иммунного статуса опухоли и индивидуализации лекарственного лечения [17].

В качестве направляющего модуля, обеспечивающего селективную доставку КТ к опухолевым клеткам и их компонентам, в зависимости от целей и объектов исследований используют антитела и их фрагменты; лиганды специфических рецепторов, локализующихся на поверхности опухолевых клеток; небольшие специфически взаимодействующие с онкомаркерами молекулы, такие, как пептиды и аптамеры.

2.1 Направляющие агенты

Молекулы иммуноглобулинов (Ig) давно известны и широко используются как эффективные направляющие модули для специфической доставки диагностических и терапевтических агентов как *in vitro* на уровне клеток и тканей, так и на уровне целого организма *in vivo*. Уже в одной из первых работ

по применению КТ для биологических исследований были показаны возможность получения комплексов КТ с молекулами IgG, способность образующихся комплексов связываться со специфичными антигенными поликлональными антителами и формировать преципитаты в растворе [14]. Позже подобные комплексы были использованы для мечения определенных молекул, находящихся в различных компартаментах клетки – на поверхности мембраны, в цитоплазме и ядре [16].

Несмотря на большое распространение полноразмерных антител в диагностических системах *in vitro*, применение их в качестве направляющих агентов *in vivo*, как правило, требует исключения их эффекторных функций и кардинальной модификации физико-химических свойств [18]. Наиболее полно этим требованиям отвечают мини-антитела формата scFv [19, 20]. Эти небольшие фрагменты антител не содержат константного домена, что не влияет на их направляющие свойства, но снижает вероятность возникновения побочных эффектов, вызванных взаимодействием константных доменов с рецепторами клеток иммунной системы и белками системы комплемента [21]. Мини-антитела к поверхностным онкомаркерам активно используют в качестве направляющих модулей для флуоресцентной визуализации опухолевых клеток и доставки к ним терапевтических агентов [22–24].

В лаборатории Nie была показана возможность использования КТ, оснащенных направляющими мини-антителами формата scFv, для визуализации опухолей, в том числе *in vivo*. После внутривенного введения конъюгатов КТ с анти-EGFR-антителом человека формата scFv в организм мыши с привитой опухолью поджелудочной железы человека наблюдалось накопление и эффективная интернализация конъюгатов клетками опухоли [25].

Основным недостатком антител формата scFv в качестве направляющих агентов является их моновалентность, так как моновалентное связывание с антигеном на поверхности клеток не обеспечивает длительного удерживания антитела и приводит к его быстрой диссоциации [26, 27]. В то же время большая площадь поверхности, характерная для КТ, обеспечивает возможность присоединения к каждой такой наночастице нескольких молекул scFv и позволяет создавать своеобразные мультивалентные конструкции с улучшенными свойствами [28].

Для специфичного узнавания некоторых белков с целью визуализации клеток и их компонентов в качестве направляющих молекул используют пептиды [29]. Применение этого подхода к созданию специализированных КТ было впервые показано для коротких генно-инженерных пептидов, специфически узнаю-

щих интегрин, в работах на нейробластоме человека [30]. Позже было доказано, что этот подход можно использовать и для специфического мечения клеток эндотелия легких, эндотелия мозга и карциномы молочной железы человека как *in vitro*, так и в живых клетках [31]. Аргинил-глицил-аспарагиновая кислота (RGD-пептид), узнающая интегрин, зарекомендовала себя хорошим альтернативным направляющим агентом для КТ, флуоресцирующих в ИК-диапазоне, при визуализации различных опухолей в организме мыши *in vivo* [32].

Еще одним перспективным направляющим агентом для доставки КТ к опухолевым клеткам являются аптамеры – специально сконструированные олигонуклеотиды, способные узнавать некоторые белки и компоненты клетки и с высокой специфичностью связываться с ними. Различные конъюгаты на основе аптамеров успешно используются для имиджинга и распознавания клеток, детекции биомаркеров и т. д. [33]. Конъюгаты КТ с аптамером, специфичным к опухолевому маркеру PSMA, избирательно окрашивали фиксированные и живые клетки опухоли простаты линии LNCaP и те же клетки в модельной среде коллагенового матрикса [34]. Было показано, что использование аптамеров в качестве направляющего агента для визуализации клеток опухоли простаты с помощью КТ так же эффективно, как использование конъюгатов КТ с анти-PSMA-антителами, но значительно дешевле [35]. Конъюгаты КТ с аптамерами можно использовать параллельно с другими направляющими агентами, такими, как пептиды, для одновременной визуализации нескольких онкомаркеров [36]. Кроме того, получение биотинилированных аптамеров, которые могут связываться с любыми КТ, конъюгированными со стрептавидином, обеспечивает создание универсальных реагентов для двухстадийной доставки КТ к опухолевым клеткам [33].

2.2 Методы присоединения направляющих агентов к КТ

На сегодняшний день применяют два основных подхода к присоединению направляющих молекул к КТ: непосредственное связывание (как правило, ковалентное) белковых молекул с активными группами на поверхности КТ и присоединение с помощью адапторов (рис. 2).

Белковые молекулы обычно присоединяют непосредственно к полупроводниковой части нанокристалла (через SH-группу либо металл-аффинной координацией гистидиновых остатков с атомами цинка оболочки нанокристаллов) или к ее гидрофильному покрытию (конъюгацией по карбоксильным, аминным и тиоловым группам с использованием специальных катализаторов; через электростатическое

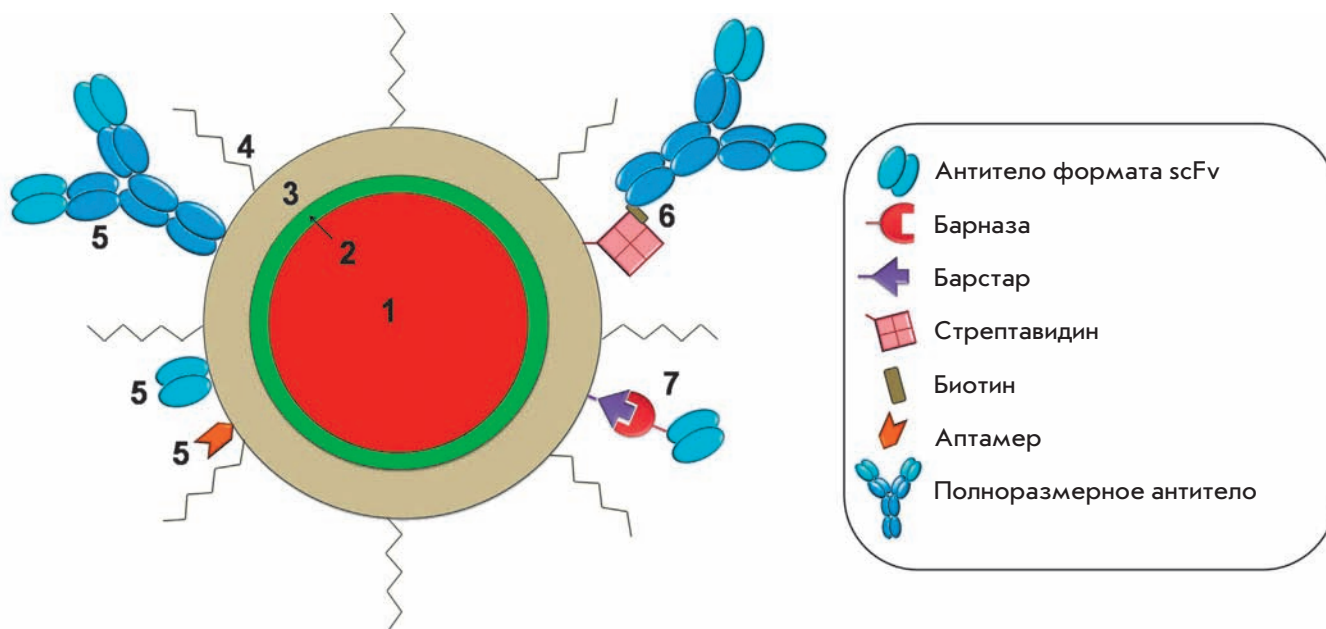


Рис. 2. Схема строения современной квантовой точки для биомедицинских исследований. 1 – флуоресцентное ядро (обычно, CdSe или CdTe); 2 – защитная оболочка (обычно, ZnS); 3 – полимерное покрытие, обеспечивающее водорастворимость КТ и возможность присоединения биологически активных молекул; 4 – молекулы ПЭГ, 5 – направляющие молекулы, присоединенные напрямую и через системы адапторов биотин-стрептавидин (6) или барназа-барстар (7).

взаимодействие). Подробно эти методы описаны в обзорах [5, 37].

Площадь поверхности нанокристаллов достаточно велика и доступна для связывания на ней нескольких биологических молекул. От 2 до 5 белковых молекул и более 50 небольших молекул (олигонуклеотидов или пептидов) могут быть связаны с одной наночастицей диаметром 4 нм [38]. Следует отметить, что реакционная способность некоторых типов биологических молекул после прямой конъюгации с нанокристаллами может существенно изменяться. В частности, антитела при конъюгации хотя и сохраняют свою специфичность, но их аффинность заметно уменьшается [39]. Кроме того, прямая конъюгация КТ с антителами требует проверки активности антитела в каждом новом конъюгате.

Более перспективным подходом к связыванию КТ с антителами представляется использование так называемых самособирающихся адапторов – небольших «липких» молекул, с высокой эффективностью и специфичностью связывающихся друг с другом, но не образующих гомодимеров. Образование комплексов с этими небольшими молекулами не влияет существенно на аффинность антител и, кроме того, дает возможность простого получения разнообразных сочетаний антител разной специфичности с КТ, флуоресцирующими в разном диапазоне, без каких-

либо дополнительных модификаций. В качестве адапторных молекул для связывания КТ с антителами используют гетеродимеризационные модули, разработанные ранее для создания генно-инженерных биспецифических и мультивалентных антител, а также для двухстадийной доставки терапевтических агентов к опухоли.

Наиболее известной и широко используемой среди таких модулей с высокой аффинностью связывания ($K_a \sim 10^{-14} - 10^{-15}$ М) является стрептавидин-биотиновая система [40]. К КТ ковалентно или через электростатические взаимодействия присоединяют стрептавидин, что позволяет им связываться с биотинилированными направляющими агентами. Впервые КТ, конъюгированные со стрептавидином, были использованы для визуализации опухолевого маркера HER2/neu на поверхности клеток опухоли молочной железы человека SKBR-3 через биотинилированные античеловеческие вторичные антитела и гуманизированные анти-HER2/neu-антитела [16]. Аналогичную трехступенчатую систему использовали для связывания КТ с фрагментами антител, специфичных к глициновым рецепторам на мембране нейронов, что позволило наблюдать за движением отдельных рецепторов в живых нейронах [41]. Трехступенчатая система на основе аффинной пары биотин-стрептавидин (первичные антитела; биоти-

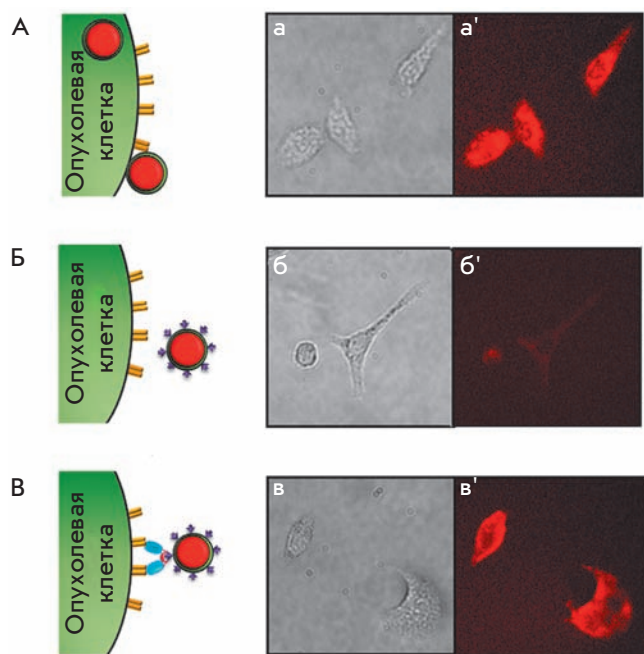


Рис. 3. Неспецифическое и специфическое взаимодействие КТ с опухолевыми клетками. Схема (слева) и результаты (справа) флуоресцентной микроскопии клеток линии SKOV-3 после их инкубации с КТ (А), конъюгатами КТ с барстаром (Б), с димером противоопухолевых антител с барназой, а затем с конъюгатами КТ с барстаром (В). Даны фотографии клеток в видимом свете (а, б, в) и их флуоресцентные изображения (а', б', в'). Обозначения см. на рис. 2.

низированные вторичные антитела; квантовые точки, конъюгированные со стрептавидином) позволяет использовать единожды конъюгированные со стрептавидином квантовые точки для визуализации множества различных мишеней без какой-либо дополнительной модификации, поскольку специфичность мечения определяется соответствующими первичными и биотинилированными вторичными антителами.

Число ступеней в процессе мечения можно сократить до двух, используя первичные антитела, связывающиеся с КТ через биотин-стрептавидиновый мостик [11]. Этот подход используется не только для антител, но и для других направляющих агентов. Так КТ, конъюгированные с интегрин-узнающим пептидом через биотин-стрептавидиновый модуль, были успешно использованы для мечения α v-субъединицы интегрина в клетках нейробластомы человека SK-N-SH [27].

Благодаря своей универсальности стрептавидин-биотиновая система получила широкое распространение для некоторых типов иммунодиагностических

исследований с использованием КТ. В настоящее время КТ, конъюгированные со стрептавидином, и биотинилированные антитела коммерчески доступны (см., например, www.invitrogen.com). В то же время применение этой системы для создания направленных флуорофоров для визуализации опухолей в организме человека *in vivo* ограничено присутствием большого количества эндогенного биотина, который может конкурировать с биотинилированными компонентами, снижая эффективность мечения.

Нами предложено для получения конъюгатов КТ с антителами использовать адапторный модуль барназа-барстар, хорошо зарекомендовавший себя при получении гетеродимерных мини-антител и их флуоресцентных производных [26, 42, 43]. Этот адапторный модуль основан на свойстве рибонуклеазы барназы из *Bacillus amyloliquefaciens* образовывать очень прочный комплекс ($K_d \sim 10^{-14}$ М) со своим природным белковым ингибитором барстаром [26].

Благодаря тому, что область связывания барназы и барстара не включает их N- и C-концевые участки, каждый из этих белков можно легко объединить генно-инженерными методами в одну полипептидную цепь с scFv-фрагментами антител. При этом сохраняется эффективность связывания компонентов модуля. Небольшие размеры барназы и барстара (110 и 89 а.о. соответственно), стабильность, хорошая растворимость и устойчивость к протеазам позволяют нарабатывать сконструированные химерные белки в достаточном количестве в бактериальных продуцентах. Кроме того, барназа в составе рекомбинантных белков играет роль внутримолекулярного шаперона, обеспечивая правильное сворачивание сложных неприродных белков, что особенно важно при создании конструкций с направляющими антителами [44].

Небольшие размеры и чрезвычайная стабильность в широком диапазоне условий позволяют легко конъюгировать как барназу, так и барстар с активными группами на поверхности КТ. Было обнаружено также, что конъюгация КТ с барстаром значительно уменьшает неспецифическое связывание КТ с мембраной клетки. Так, флуоресцентные нанокристаллы, которые обычно неспецифически налипают на клетки аденокарциномы яичника человека SKOV-3 и проникают внутрь (рис. 3, А), после конъюгации с барстаром становятся практически нейтральными по отношению к этим клеткам (рис. 3, Б). В то же время барстар на поверхности КТ дает возможность с помощью адапторной системы барназа-барстар дополнительно оснастить их направляющими антителами и обеспечить эффективное и специфичное мечение раковых клеток (рис. 3, В).

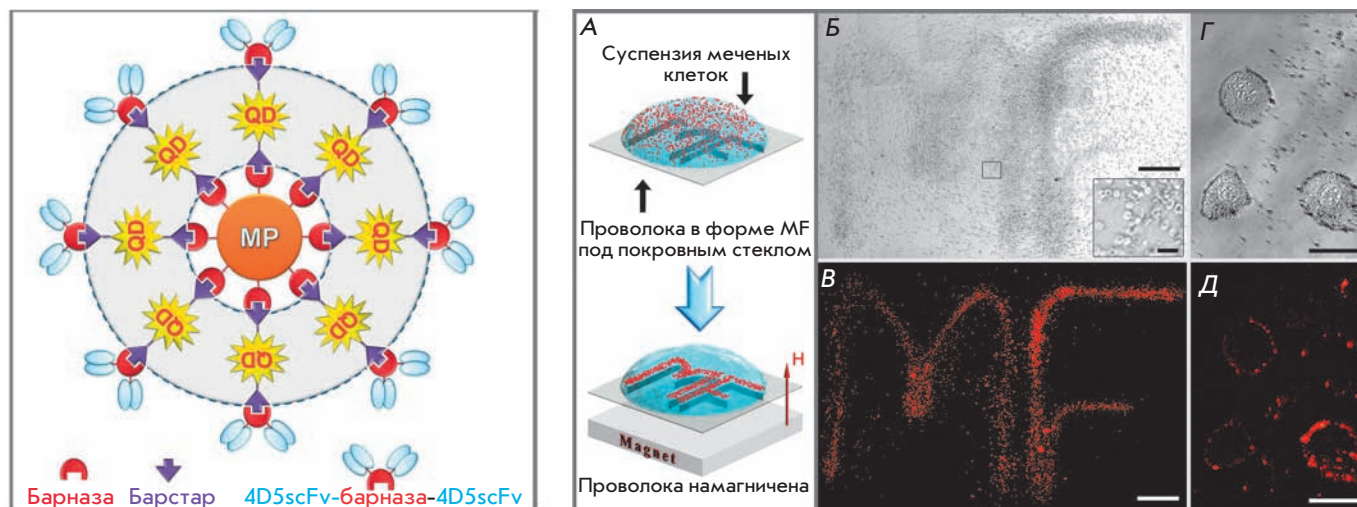


Рис. 4. Мультифункциональные наноконструкции на основе КТ, магнитных частиц и противоопухолевых мини-антител, собранные с помощью адапторной системы барназа-барстар. Схема строения наноконструкции (слева) и доказательство мультифункциональности (справа). Опухолевые клетки SKOV-3, меченные наноконструкциями, выстраиваются вдоль намагниченной проволоки в форме букв MF (А). Приведены фотографии в видимом свете (Б – увеличение 100х и Г – отдельные клетки) и флуоресцентные изображения (В – увеличение 100х и Д – отдельные клетки). QD – квантовые точки, MP – магнитные частицы. Адаптировано из [28] (Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010 107:5827–5832) с разрешения National Academy of Sciences of the United States of America: [Proc. Natl. Acad. Sci. USA], copyright (2010).

Важное преимущество модуля барназа-барстар – точное соотношение 1 : 1 компонентов в комплексе и полное отсутствие их самоагрегации, а также высокая аффинность взаимодействия, превосходящая значения всех других димеризационных систем, за исключением стрептавидин-биотиновой. В отличие от стрептавидин-биотиновой системы, использование системы барназа-барстар основано на генно-инженерных технологиях и не требует никаких ковалентных модификаций антител.

Адапторная система барназа-барстар была успешно использована нами для создания флуоресцентных комплексов для визуализации опухолевых клеток, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2/neu, на основе антител 4D5scFv и КТ двух типов: 1) модифицированных меркаптоуксусной кислотой; 2) покрытых полимерной оболочкой [45, 46]. В обоих случаях наблюдали эффективное и избирательное окрашивание мембран после инкубации клеток аденокарциномы молочной железы и аденокарциномы яичника человека с полученным флуоресцентным комплексом.

Более того, было показано, что КТ, оснащенные с помощью адапторов направляющими антителами, могут быть присоединены к молекулам или наночастицам другой природы и, таким образом, представляют собой компоненты «молекулярного кон-

структора» [43]. Реализуя идею такого конструктора, мы создали на основе адапторного модуля барназа-барстар самособирающиеся мультимодальные конструкции с использованием КТ и магнитных частиц. Полученные флуоресцентно-магнитные наночастицы оснащены гуманизированными мини-антителами к онкомаркеру HER2/neu и способны эффективно и избирательно метить соответствующие опухолевые клетки [28]. В результате флуоресцентно-меченные опухолевые клетки приобретают свойство магнитоуправляемости (рис. 4).

2.3 Проблема неспецифического связывания КТ

Существенным препятствием для избирательного мечения биологических объектов с помощью флуоресцентных меток на основе КТ является их тенденция к «налипанию», т.е. неспецифическому связыванию с мембраной клетки, белками и составляющими внеклеточного матрикса, а также их неконтролируемое проникновение внутрь клеток. Например, показано, что частицы с сильным отрицательным или положительным зарядом, содержащие на поверхности карбоксильные или аминогруппы соответственно, имеют высокий уровень неспецифического связывания с клетками и тканями [47, 48]. Причиной такого неспецифического связывания может быть электростатическое взаимодействие между заряженными

группами на поверхности КТ и заряженными участками белков и других молекул на поверхности клеток.

Другой причиной неспецифического связывания КТ с поверхностью клеток может являться гидрофобное взаимодействие между липидами клеточной мембраны и молекулами стабилизатора (например, три-*n*-октилфосфина или олеат-аниона), остающегося на поверхности КТ после их синтеза, из-за неполного покрытия ядра наночастицы лигандом, обеспечивающим гидрофильность, или же из-за неустойчивого связывания этого лиганда. Так, показано, что КТ, в которых использованы цистеин, МУК, дигидролипоевая и другие меркаптокарбоновые кислоты, которые известны своей динамической и неустойчивой связью Zn-S, проявляют наиболее высокий уровень неспецифического связывания [47].

Установлено, что уровень неспецифического связывания сильно зависит от типа клеток [47, 49], что может объясняться различным содержанием заряженных и гидрофобных областей на мембране тех или иных клеток.

Для уменьшения неспецифического связывания КТ дополнительно покрывают слоем инертных молекул. Одним из таких веществ, широко используемым в настоящее время, является ПЭГ – нетоксичный гидрофильный полимер, который обычно применяется для увеличения биосовместимости лекарств [48]. Модифицированные ПЭГ квантовые точки имеют поверхностный заряд, близкий к нейтральному, и коллоидно стабильны в различных экспериментальных условиях. Кроме того, ПЭГ снижает способность КТ взаимодействовать с поверхностью клеток или с белками внеклеточного матрикса, т.е. приводит к пассивированию поверхности КТ [50].

Следует отметить, что, несмотря на успешное применение КТ, покрытых ПЭГ, для экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*, для некоторых целей такой модификации оказывается недостаточно. Кроме того, покрытые ПЭГ частицы обладают значительно большим гидродинамическим диаметром, что затрудняет их доступ к биологическим мишеням [51].

Чтобы минимизировать неспецифическое связывание КТ, не увеличивая их размера, был предложен метод покрытия нанокристаллов нейтральной гидроксильной оболочкой [52]. Гидродинамический диаметр полученных нанокристаллов составляет 13–14 нм, что на 50% меньше размера нанокристаллов, модифицированных ПЭГ. При использовании полученных комплексов для визуализации клеток HeLa наблюдалось уменьшение уровня неспецифического связывания в 140 раз по сравнению с нанокристаллами с карбоксильными группами на поверхности и в 20 раз по сравнению с биотинилированными КТ.

Для направленной доставки таких нанокристаллов необходимо оснащать их нацеливающими молекулами, что ведет к частичной потере материала и уменьшению выхода конечного продукта. В то же время вполне реально уменьшить неспецифическое налипание КТ на мембрану клетки и одновременно обеспечить специфическое связывание наночастицы с определенными рецепторами, экспрессирующимися на поверхности опухолевой клетки. Было отмечено, что некоторые небольшие нейтральные молекулы, такие, как пептиды или маленькие белки, способны уменьшать неспецифическое связывание КТ [52]. Нами было показано, что этим свойством обладает также компонент адапторной системы – барстар (см. выше раздел 2.2, рис. 3).

3. ДИАГНОСТИКА *in vitro*

Одной из наиболее перспективных и быстро развивающихся областей применения КТ является их использование в качестве флуоресцентных меток при изучении опухолевых клеток *in vitro*: для визуализации опухолевых клеток и для определения местонахождения отдельных молекул, экспрессирующихся в них. Уникальные свойства КТ, дающие возможность многоцветного мечения и наблюдения флуоресценции объектов в течение длительного времени, позволяют существенно расширить границы традиционных методов, используемых в этой области. На сегодняшний день из всех вариантов биомедицинского использования КТ диагностика *in vitro* – это единственное применение КТ, которое может быть быстро внедрено в клиническую практику (в отличие от применения КТ *in vivo*, требующего длительных исследований токсичности КТ и отдаленных последствий их введения в организм).

Основные работы ведутся в трех направлениях: 1) визуализация опухолевых клеток, гиперэкспрессирующих определенные онкомаркеры; 2) окрашивание тканей и их срезов; 3) наблюдение в реальном времени за отдельными молекулами и клетками.

3.1 Визуализация опухолевых клеток

Визуализация опухолевых клеток и определение в них отдельных онкомаркеров имеет большое практическое значение. Большинство используемых для визуализации онкомаркеров представляют собой рецепторы, гиперэкспрессирующиеся на поверхностной мембране опухолевых клеток и практически не экспрессирующиеся в нормальных тканях. Высокий уровень экспрессии таких маркеров свидетельствует о наличии опухолевого процесса в организме, а их детекция и количественная оценка важны для ранней диагностики, классификации и терапии опухолей [51].

Буквально в течение нескольких лет после выхода пионерских работ по созданию и использованию биосовместимых КТ [14, 15] сразу несколько групп заявили о возможности использования конъюгатов КТ для визуализации опухолевых клеток. К настоящему времени созданы конъюгаты КТ с различными направляющими агентами (антителами, лигандами, пептидами), предназначенные для визуализации клеток клинически значимых опухолей человека: карциномы простаты [53], аденокарциномы и карциномы протоков молочной железы [21, 54, 55], карциномы поджелудочной железы [56], глиобластомы мозга [32] и плоскоклеточной карциномы языка [57].

Основные усилия исследователей в этом направлении были сосредоточены на оптимизации свойств КТ для их применения в опытах на живых клетках и на уровне целого организма. Преимущественный упор был сделан на хорошую растворимость в водных растворах, биосовместимость и низкую токсичность КТ, а также на оснащение КТ направляющими молекулами, обеспечивающими специфичность мечения. За короткий срок были разработаны достаточно простые, дешевые и хорошо воспроизводимые методы визуализации раковых клеток с помощью КТ для диагностики клинически значимых видов опухолей и прогноза течения заболевания (таблица). Таким образом, создан большой методический задел для внедрения этих методов в клиническую практику и дальнейших исследований *in vivo* с целью визуализации опухолей и их метастазов непосредственно в живом организме.

3.2 Одновременная детекция нескольких онкомаркеров

Как правило, направляющие молекулы (антитела, пептиды, аптамеры и др.), избирательно связывающиеся с поверхностным онкомаркером, обеспечивают высокую специфичность мечения соответствующих опухолевых клеток [17]. В то же время такая особенность опухолевых клеток, как их чрезвычайная изменчивость в процессе развития заболевания и в ответ на воздействие лекарственных агентов, ставит перед исследователями задачу одновременной визуализации сразу нескольких поверхностных онкомаркеров. Для решения этой задачи в силу своих физико-химических свойств КТ подходят как нельзя лучше (см. раздел 1).

Принципиальная возможность использования КТ для одновременной множественной детекции была продемонстрирована на примере пяти опухолевых маркеров в культуре клеток опухоли молочной железы человека. Одновременное выявление рецепторов ER, PR, EGFR, mTOR и HER2/neu с помощью КТ, флуоресцирующих в разных областях спектра, точно коррелирует с результатами традиционных методов,

включая иммуногистохимию, Вестерн-блот и флуоресцентную гибридизацию *in situ*, значительно ускоряя анализ и снижая его стоимость [61].

Одновременная визуализация двух предполагаемых опухолевых маркеров, интегрин $\alpha_v\beta_3$ и нуклеолина, с использованием КТ, конъюгированных с RGD-пептидом и аптамером AS1411 соответственно, позволила сравнить локализацию этих маркеров в клетке [36]. С помощью конфокальной микроскопии были подтверждены интернализация нуклеолина и поверхностное распределение интегрин, что, возможно, позволит уточнить их участие в процессах, происходящих в опухолевых клетках.

Результаты этих работ показывают, что конъюгаты КТ с направляющими молекулами обладают мощным потенциалом в качестве компонентов новых систем для оценки типа опухолей, стадии их прогрессии и метастатического потенциала на основе одновременной визуализации различных опухолевых маркеров и определения их клеточной локализации (*англ.* multiplex imaging).

Фундаментальные исследования онкологических процессов требуют не только детекции гиперэкспрессирующихся в раковых клетках маркеров, но и выявления множества других, часто низкокопийных белков. Современным золотым стандартом для определения низкокопийных белков является иммуноферментный анализ (ИФА), чувствительность которого достигает пикомолярной. Этот метод широко используется, но он довольно трудоемок, недешев, занимает много времени и не дает возможности одновременного определения нескольких белков. Замена органических флуорофоров и цветных реагентов в иммуноферментных исследованиях на КТ сама по себе не обеспечивает значительного преимущества в чувствительности (чувствительность анализа с КТ ~ 100 пмоль) [70], но только применение КТ с разными спектральными характеристиками дает возможность одновременной специфической визуализации нескольких белков. Так, удалось одновременно визуализировать в сэндвич-ИФА четыре токсина, используя четыре разных типа КТ с флуоресценцией в диапазоне 510–610 нм с возбуждением на одной длине волны [70]. К сожалению, пока авторам не удалось осуществить количественную оценку, и для создания хорошего иммунофлуоресцентного многоцветного теста необходима дальнейшая работа. В другой работе были продемонстрированы простота и наглядность одновременной детекции двух белков с двумя различными по цвету КТ в Вестерн-блоте [71]. Нет сомнения в том, что одновременное многоцветное мечение с помощью КТ представляет собой новый мощный метод, который позволит решать не только традиционные, но и принципиально новые

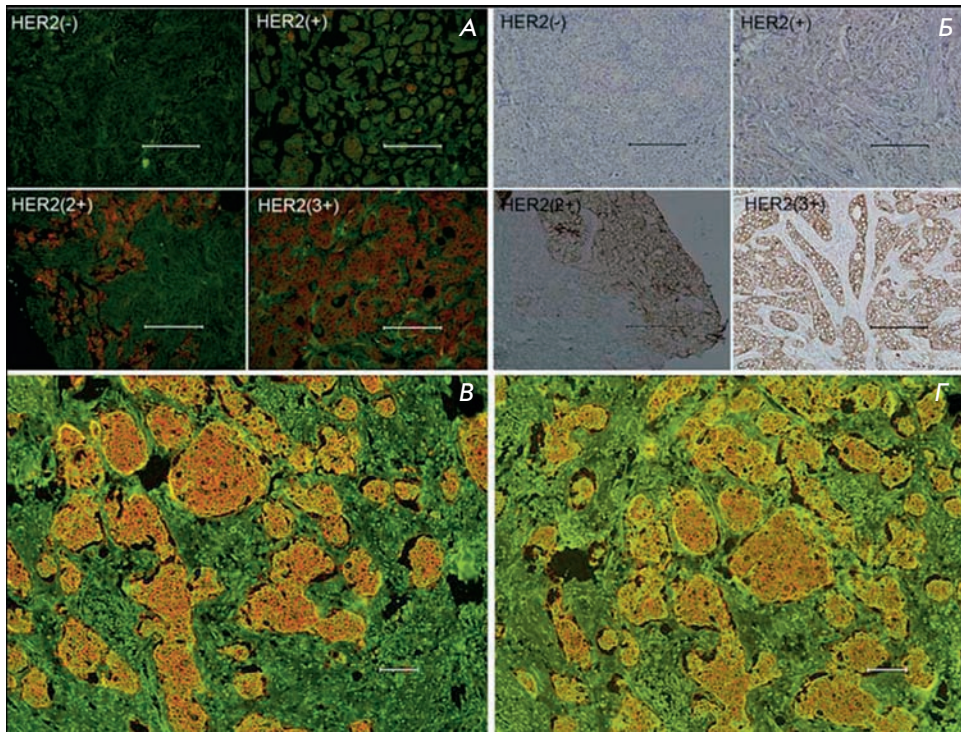


Рис. 5. Преимущества КТ в иммуногистохимическом анализе. Окрашивание тканей с различным уровнем экспрессии HER2 с использованием КТ (А) и стандартного метода с пероксидазой (Б). Фотоустойчивость образцов, окрашенных КТ через 2 (В) и 75 сут (Г). Шкала – 100 мкм. Адаптировано из [74] (Chen С., Peng J., Xia H., Yang G., Wu Q., Chen L., Zeng L., Zhang Z., Pang D., Li Y. *Biomaterials*. 2009 30:2912–2918) с разрешения Elsevier: [Biomaterials], copyright (2009).

задачи, решение которых с применением известных подходов было невозможно или чрезвычайно трудоемко.

Одновременное множественное мечение с помощью КТ с разными спектральными характеристиками дает также неоспоримые преимущества в исследованиях, требующих высокопроизводительного скрининга молекул. КТ успешно используют для анализа многочисленных компонентов клеточных систем с помощью технологии микрочипов (*англ.* microarray technology), а также для параллельного анализа геномного и протеомного содержимого здоровых и больных клеток [72]. Яркость и устойчивость КТ значительно повышают чувствительность и способность к параллельной детекции компонентов сложных смесей. Полученные результаты могут способствовать лучшему пониманию сигнальных путей в клетке и применяться для разработки новых терапевтических подходов.

3.3 Иммуногистохимический анализ

Наиболее широко используемым в клинике методом диагностики опухолей является иммуногистохимический анализ (ИГХ). Этот метод морфологического исследования, в основе которого лежит визуализация и оценка с помощью микроскопии результатов реакции антиген-антитело в срезах биопсированных тканей, позволяет не только увидеть наличие и интенсивность сигнала, но и оценить распределение сигнала в клетке (окрашивание мембраны, ци-

топлазмы, ядра и других структурных элементов). Иммунохимическое окрашивание фиксированных формалином тканей и парафиновых срезов образцов биопсии опухолей – непростая задача из-за высокой аутофлуоресценции тканей и уменьшения количества антигена в процессе фиксации и включения в парафин.

Оказалось, что для решения этой задачи как нельзя лучше подходят КТ. С использованием КТ были получены изображения фиксированных срезов тканей базально-клеточной карциномы человека [60], опухоли молочной железы мыши, гиперэкспрессирующей человеческий рецептор HER2/neu [16], базально-плоскоклеточной карциномы кожи человека [73]. На примере ткани опухоли молочной железы человека показано также, что на основе КТ можно создавать зонды для количественного и очень чувствительного обнаружения слабой экспрессии поверхностных раковых маркеров, в частности онкомаркера HER2/neu [74]. Исследователи также отмечают высокую фотостабильность препаратов, окрашенных КТ: интенсивность их флуоресценции не меняется в течение 9–75 дней [74] (*рис. 5*).

Комбинирование традиционных методик ИГХ с флуоресцентными красителями на основе КТ позволяет значительно улучшить разрешение и чувствительность метода (см. обзор [17]), а также дает возможность одновременной визуализации нескольких маркеров [75]. Кроме того, применение КТ делает метод ИГХ намного более наглядным (*рис. 5*).

Визуализация опухолевых клеток человека с использованием КТ

Опухоль	Линия клеток (тип опухоли)	Рецептор-мишень	Направляющий модуль	Тип КТ	Метод визуализации	Примечание	Ссылка
Опухоль простаты	C4-2	PSMA	Полноразмерные моноклональные антитела J591	CdSe/ZnS КТ, покрытые амфифильными полимерами	Флуоресцентная микроскопия клеток в культуре и тканей <i>post mortem</i> , неинвазивное получение изображения целого животного <i>in vivo</i>	Проведено сравнение активной и пассивной доставки	[53]*
			Аптамер A10 RNA	Коммерческие CdSe/ZnS КТ, покрытые полимером с карбоксильными группами на поверхности (EviTag)	Конфокальная микроскопия клеток в культуре	Созданы мультифункциональные (флуоресцентные и терапевтические) конструкции КТ с доксирубицином	[55]
	S4-2B (опухоль простаты с метастазами в костной ткани)	Полноразмерные моноклональные антитела J591	Qdot® 800 Antibody Conjugation Kit (Invitrogen)	Неинвазивная визуализация <i>in vivo</i> с помощью системы для визуализации IVIS	Показана возможность визуализации метастазов в костной ткани	[58]*	
LNCaP		α _v β ₃ -Интегрин	Пептид GPI	CdSe/ZnS КТ, покрытые цистеином, модифицированные ПЭГ	Флуоресцентная микроскопия клеток в культуре, флуоресцентная визуализация органов <i>post mortem</i>	Созданы КТ небольшого размера, способные быстро выводиться из организма через почки	[59]*
			Пептид RGD				
Опухоль молочной железы	MDA-MB-435 (карцинома протоков молочной железы)	Эндотелиальные клетки опухолевых сосудов	Пептиды GFE и LuP-1	CdSe/ZnS КТ, модифицированные МУК	Конфокальная микроскопия клеток в культуре и тканей <i>post mortem</i>	Проведено сравнение уровня поглощения органами РЭС обычных КТ и КТ, модифицированных ПЭГ	[31]*
			Гуманизированные моноклональные антитела Trastuzumab (Herceptin®)	Коммерческие CdSe/ZnS КТ, покрытые полимером с карбоксильными группами на поверхности (Quantum Dot Corporation)	Флуоресцентная микроскопия фиксированных клеток в культуре	Показана возможность одновременной визуализации нескольких мишеней как на поверхности мембраны, так и внутри клетки	[16]
	р-Гликопротеин	Первичные анти-р-гликопротеин-антитела и вторичные антимышьи поликлональные антитела, конъюгированные с КТ	CdSe/ZnS КТ, модифицированные цистеином и покрытые полимером с аминогруппами на поверхности	Конфокальная микроскопия клеток в культуре, флуоресцентная иммуногистохимия	Проведено сравнение фотостабильности КТ с органическими красителями	[60]	
	α _v β ₃ -Интегрин	Пептид RGD (аргинил-глицил-аспарагиновая кислота)	CdTe/ZnS, модифицированные ПЭГ, с аминогруппами на поверхности (коммерческое название «Qdot® 705 ITC™ amino (PEG) quantum dots», Invitrogen)	Флуоресцентная микроскопия клеток в культуре	—	[32]	
Опухоль молочной железы	MCF-7 (аденокарцинома), BT-474 (карцинома протоков молочной железы)	EGFR, HER2/neu	Полноразмерные моноклональные антитела	Qdot® Antibody Conjugation Kit (Invitrogen)	Флуоресцентная микроскопия фиксированных тканей	Показана возможность использования КТ для ИТХ с одновременным мечением нескольких онкомаркеров	[61]
			Гуманизированные моноклональные антитела Trastuzumab (Herceptin®)	Qdot® Antibody Conjugation Kit (Invitrogen)	Конфокальная микроскопия <i>in vivo</i>	Наблюдение за передвижением отдельных частиц в живом организме в реальном времени после введения в хвостовую вену. Показаны движение, скорость, траектория движения КТ по сосудам опухоли и их миграция в опухолевые клетки	[54]*

				Коммерческие CdSe/ZnS, покрытые полимером с карбоксильными группами на поверхности (Invitrogen)	Флуоресцентная микроскопия и проточная цитометрия клеток в культуре, визуализация опухолей <i>in vivo</i> на модельном животном			Создание сложных мультифункциональных иммунолипосом с КТ и мини-антителами	[62]
			Мини-антитела формата scFv	Qdot@ 800 Antibody Conjugation Kit (Invitrogen)	Наблюдение за передвижением отдельных частиц в живом организме в реальном времени после введения в хвостовую вену				[63]*
			Гуманизированные моноклональные антитела Trastuzumab (Herceptin®)	Qdot@ Antibody Conjugation Kit (Invitrogen)	Флуоресцентная микроскопия, проточная цитометрия			Измерения уровня экспрессии рецептора в клетке	[55]
			Мышьи моноклональные анти-AFP-антитела	CdSe/ZnS КТ, модифицированные тиоликолевой кислотой, растворены в PBS	Визуализация опухолей <i>in vivo</i> и отдельных органов <i>post mortem</i> ; флуоресцентная микроскопия тканей <i>post mortem</i>			Сравнение пассивной и активной доставки	[64]*
			Мышьи моноклональные анти-AFP-антитела	CdSe/ZnS с максимумом 590 нм, модифицированные тиоликолевой кислотой	Биохимический анализ крови, конфокальная микроскопия тканей, количественный анализ уровня Cd и Se с использованием масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS)			Визуализация опухоли и метастазов. Проведена оценка токсичности и биосовместимости, исследована фармакокинетика, количественное распределение по тканям	[65]*
			Анти-клаудин-4 и анти-PSCA-моноклональные антитела	InP/ZnS, модифицированные меркаптоангарной кислотой	Получение изображений <i>in vivo</i> с помощью системы «Maestro», конфокальная микроскопия срезов			Успешное использование для визуализации модельной опухоли с нетоксичными КТ, не содержащими кадмия	[56]*
			Мини-антитела формата scFv	CdSe/ZnS, покрытые амфифильным полимером и модифицированные короткими цепочками ПЭГ	Конфокальная микроскопия срезов тканей			Изучено распределение по органам при пассивной и активной доставке	[25]*
			EGF	Qdot@ 800 ITK™ amino (PEG) quantum dots (Invitrogen)	Получение оптических серий изображений срезов органов <i>post mortem</i>			Исследована динамика накопления направленных и ненаправленных КТ в опухолевой ткани	[66]*
			Моноклональные антитела 4E3	CdSe/ZnS, DHLA модифицированные DHLA	Флуоресцентная микроскопия живых клеток в культуре			Стабильность окрашивания в течение недели, возможность одновременных исследований с КТ	[67]
			Пептид RGD	CdTe/ZnS, модифицированные ПЭГ, с аминокетонами на поверхности (коммерческое название «Qdot@ 705 ITK™ amino (PEG) quantum dots», Invitrogen)	Конфокальная микроскопия клеток в культуре и криосрезов опухолевой ткани. Получение 3D-изображения животного <i>in vivo</i> с помощью системы «Maestro» для визуализации «Maestro»			Сравнение активной и пассивной доставки. Ясно видно накопление КТ в органах РЭС в обоих случаях	[32]*
			Первичные анти-р-гликопротеин-антитела, вторичные биотинилированные анти-мышьиные поликлональные антитела, стрептавидин, конъюгат биотина с КТ	CdTe, модифицированные тиоликолевой кислотой	Флуоресцентная микроскопия			Использованы КТ, синтезированные в водных растворах	[57]
			EGF	Коммерческие CdSe/ZnS, покрытые полимером, конъюгированные со стрептавидином (Invitrogen)	Конфокальная микроскопия и проточная цитометрия клеток в культуре			Отслеживание путей передвижения отдельных молекул в клетке	[11]
			EGFR	EGF	Флуоресцентная микроскопия клеток, FRET, атомно-силовая микроскопия			Отслеживание путей передвижения отдельных молекул в клетке и димеризации рецепторов	[68]
			Фолатный рецептор	InP/ZnS	Конфокальная и двухфотонная микроскопия клеток в культуре			Специфическая визуализация опухолевых клеток с использованием нетоксичных КТ, не содержащих кадмия	[69]

*Визуализация опухолей в организме модельных животных.

3.4 Наблюдение в реальном времени за молекулярными процессами и клетками

Высокая устойчивость КТ к фотовыцветанию, а также их высокая яркость позволяют использовать их для визуализации процессов, происходящих в клетках, в том числе для отслеживания динамики отдельных молекул [41]. Особый интерес представляют мембранные белки, исследование местонахождения и динамики которых важно для понимания таких процессов, как хемотаксис, межклеточная и внутриклеточная передача сигналов. Так, КТ, конъюгированные с соответствующими направляющими лигандами, были успешно использованы для визуализации динамики рецепторов глицина [12] и γ -аминомасляной кислоты [76] в клетках нейронов в культуре.

Поскольку многие значимые онкомаркеры представляют собой белки, выполняющие в нормальных клетках регуляторные функции и участвующие в передаче сигнала, изучение функционирования таких белков важно для понимания природы и механизмов процесса малигнизации. КТ, конъюгированные с эпидермальным фактором роста (EGF), были использованы для изучения механизмов интернализации EGF и путей передачи сигнала с участием белков семейства трансмембранных рецепторов тирозинкиназ erbB1/2/3 [11].

Было показано, что КТ могут быть использованы для изучения подвижности опухолевых клеток с целью определения их инвазивного потенциала [77]. Применение КТ в качестве маркеров для визуализации траектории движения клеток менее трудоемко и позволяет получать более достоверные данные, чем традиционный анализ в камере Бойдена.

Эти новые и чрезвычайно интересные направления исследований пока не нашли применения в клинической диагностике, но безусловно будут развиваться как область фундаментальной науки и способствовать получению новых знаний о патогенезе опухолей.

4. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ *in vivo* НА МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

За последние пять лет достигнуты значительные успехи в применении КТ в качестве флуорофоров в экспериментах на клетках и фиксированных тканях. В то же время использование этих наночастиц для визуализации в многоклеточных организмах, особенно таких высокоорганизованных, как млекопитающие, только начинает разрабатываться.

При флуоресцентном мечении на уровне целого организма возникают две основные проблемы: 1) ослабление сигнала в связи с увеличением размеров организма и толщины тканей; 2) усложнение доставки флуорофоров к целевым клеткам и тканям.

Глубина проникновения флуоресценции является основной проблемой, поскольку биологические ткани ослабляют большую часть сигналов, используемых для визуализации, и, кроме того, обладают значительной аутофлуоресценцией в зеленом диапазоне. Однако в ИК-диапазоне спектра существует так называемое «окно прозрачности» (650–1300 нм), в котором поглощение света живыми тканями минимально. Существование такого окна объясняется тем, что основные хромофоры млекопитающих (кровь, флавины, витамины и NAD(P)H) имеют минимальный уровень поглощения в этой области [78]. Поэтому для визуализации *in vivo* используют КТ, флуоресцирующие в ближнем ИК-диапазоне (700–800 нм), что позволяет повысить яркость получаемого сигнала и снизить фон.

Транспорт флуорофора к клеткам-мишеням в организме млекопитающих сложен и многоэтапен, поскольку транспортируемые вещества должны преодолеть ряд структурных и физиологических барьеров. Среди них можно отметить эндотелий стенок сосудов, иммунный барьер и метаболическую деградацию вводимых веществ. Кроме того, введенный внутрисистемно флуорофор вместе с током крови может попадать в нецелевые органы и ткани организма и накапливаться там, ухудшая контрастность, а также увеличивая вероятность ложноположительных сигналов и проявления токсического эффекта. Поэтому излишки флуорофора, не связавшиеся с целевыми клетками, должны быстро и полностью выводиться из организма.

4.1 Детекция опухолей с использованием КТ

В живом организме накопление введенных внутривенно КТ в опухолевой ткани для ее последующей визуализации возможно благодаря двум механизмам: 1) пассивному, характерному для частиц определенного размера и 2) активному, с помощью направляющего агента [53] (рис. 6).

В случае пассивного механизма частицы нанометровых размеров избирательно накапливаются в опухолевой ткани благодаря ее структурным особенностям. Такие частицы легко проникают в опухоль за счет увеличенной проницаемости стенок сосудов и задерживаются в ней из-за отсутствия нормального лимфатического дренирования. Доказано, что капиллярная проницаемость эндотелиального барьера во вновь васкуляризуемых опухолях значительно выше, чем в нормальных тканях. Нормальные ткани выстланы нефенестрированным сосудистым эндотелием, и прохождение макромолекул и наночастиц в ткань затруднено. Кровеносные сосуды, сформированные в процессе индуцированного опухолью ангиогенеза, имеют нехарактерное строение и широкие эндотелиальные поры. Эти поры настолько велики,

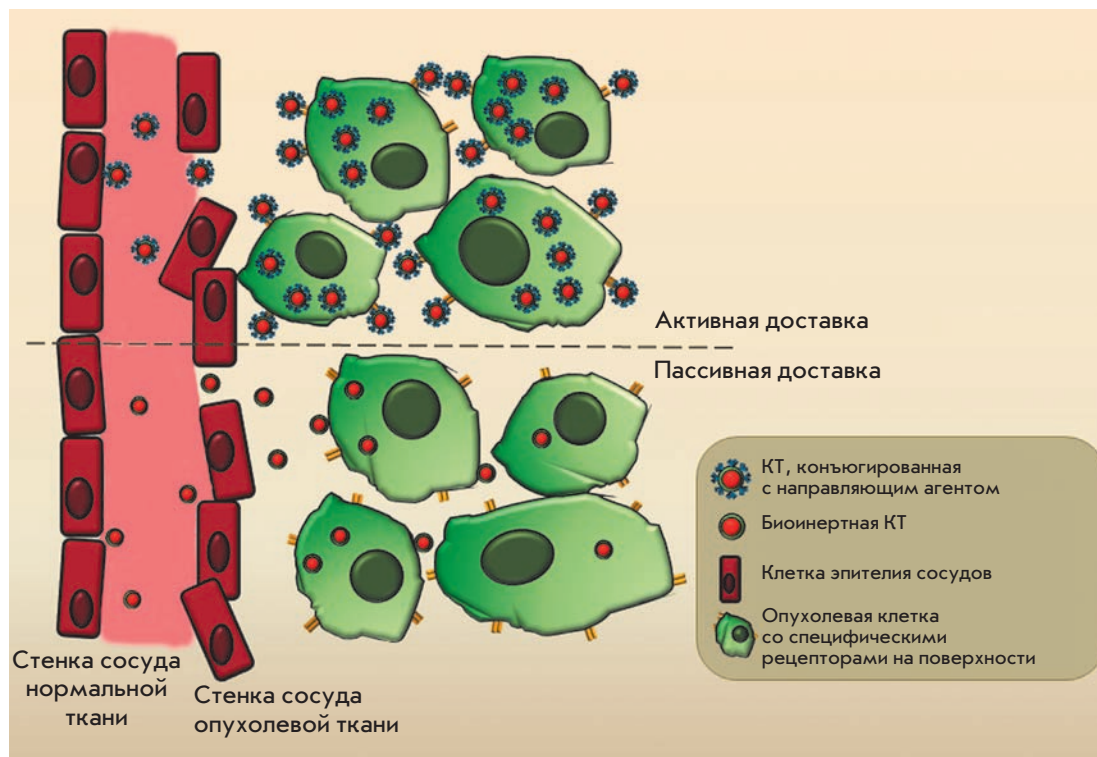


Рис. 6. Механизмы доставки КТ в опухоль после внутривенного введения.

что молекулы размером до 400 нм могут выходить из сосудов и накапливаться в опухолевой ткани [79]. Кроме того, в опухолевой ткани практически отсутствует дренирование лимфатической системой, поэтому макромолекулы остаются там длительное время. Описанный эффект увеличенной проницаемости и удерживания (*англ.* EPR-эффект – *enhanced permeability and retention*) используется для доставки в опухоли терапевтических и диагностических агентов на основе латексов, липосом и других частиц [80]. При этом для увеличения избирательности мечения в случае пассивной доставки используют «биоинертные» КТ, покрытые ПЭГ и имеющие минимальный уровень неспецифического связывания с белками и клетками крови [53].

Для активной доставки КТ к опухолям их снабжают направляющими молекулами, связывающимися со специфическими рецепторами, экспонированными на поверхности опухолевых клеток (см. раздел 2.1).

Впервые возможность прижизненного мечения опухолей квантовыми точками была продемонстрирована на мышинных моделях. Показано, что после внутривенного введения конъюгаты КТ с пептидами, специфичными к различным типам опухолей и их сосудам, избирательно накапливаются в сосудистой сети опухоли [31].

Первый успех применения КТ *in vivo* стимулировал появление большого числа работ, посвященных

прижизненной визуализации модельных опухолей человека в организме животных с применением КТ, нацеленных на различные опухолевые маркеры. В качестве направляющих агентов одинаково успешно использовали полноразмерные антитела и их фрагменты, специфические пептиды и природные лиганды (*таблица*). Результаты этих работ показывают, что использование активного механизма доставки по сравнению с пассивной доставкой значительно увеличивает накопление КТ в опухоли независимо от типа использованных КТ и от типа направляющего агента (*рис. 7*). Использование направленных КТ в качестве флуорофоров в сочетании с современными методами оптического имиджинга также позволяет визуализировать не только солидные опухоли, но и метастазы в органах [65] и в костной ткани [58], а также выявлять микрометастазы на ранних стадиях заболевания [81]. Необходимо отметить, что во всех случаях наряду с успешным маркированием опухолей *in vivo* как активным, так и пассивным методом также наблюдалось неспецифическое накопление КТ в различных органах модельных животных, прежде всего в печени, селезенке и лимфоузлах (*рис. 7*).

КТ могут также иметь большое диагностическое значение при местном введении. Так, например, было показано, что КТ различного цвета, введенные в периферические участки тела, локализовались в раз-

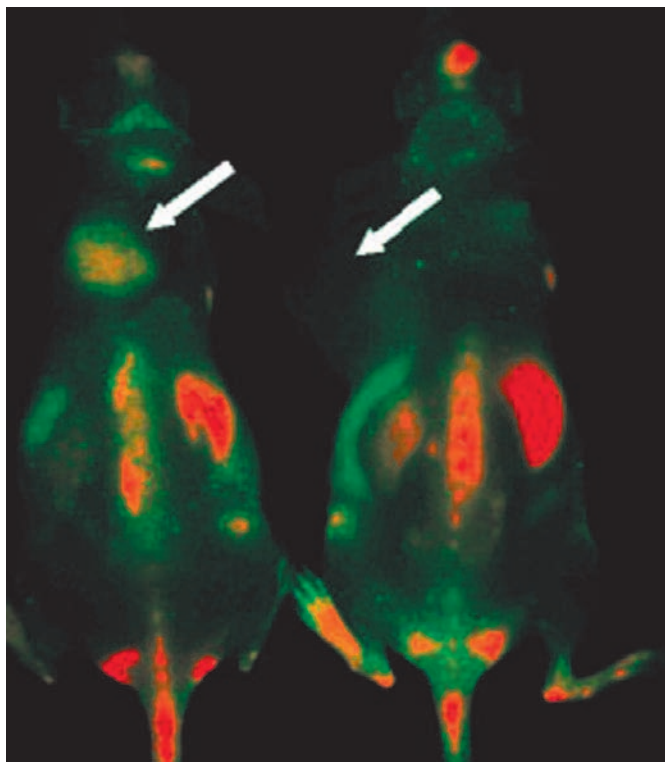


Рис. 7. Флуоресцентная ИК-визуализация мышей с опухолями глиобластомы человека U87MG (привиты под левую лопатку, указаны белыми стрелками). Животному слева были введены внутривенно конъюгаты КТ с направляющим пептидом RGD, животному справа – неконъюгированные КТ в той же концентрации. Зеленым цветом показана аутофлуоресценция тканей, красным – флуоресценция КТ. Заметно сильное накопление КТ в печени, костном мозге и лимфатических узлах. Адаптировано из [32] (Cai W., Shin D.W., Chen K., Gheysens O., Cao Q., Wang S.X., Gambhir S.S., Chen X. *Nano Lett.* 2006 6:669–676) с разрешения American Chemical Society: [Nano Letters], copyright (2006).

ных лимфоузлах, окрашивая их в соответствующие цвета [82]. В последнее время большой объем исследований посвящен визуализации сторожевых лимфоузлов, по которым обычно начинается распространение метастазов [83, 84]. Интраоперационная визуализация первичной опухоли вместе со сторожевыми лимфоузлами дает возможность определить размер операционного поля и необходимость лимфодиссекции [85].

Размер КТ и их способность к двухфотонному возбуждению привлекли внимание исследователей к этим частицам как к перспективному контрастирующему агенту для ангиографии, альтернативному традиционно применяемому для этих целей флуорес-

центному декстрану. Благодаря большому сечению двухфотонного поглощения (на 2–3 порядка больше, чем у традиционных органических красителей) КТ можно возбуждать в ИК-диапазоне. Это позволяет добиться более высокого разрешения и на большей глубине ткани (так как длинные волны рассеиваются меньше, чем короткие), а также уменьшить степень фототоксичности (так как возбуждающие фотоны в ИК-части спектра обладают меньшей энергией и, следовательно, менее разрушительны для исследуемой ткани) [86]. Действительно, использование двухфотонного возбуждения КТ для контрастирования кровеносных сосудов опухолевой ткани значительно улучшает контрастность изображения по сравнению с традиционными методами [87].

Таким образом, результаты работ по прижизненной визуализации опухолей, приведенные выше, показали, что из-за высокого уровня поглощения органами ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) и отсутствия полного выведения из организма (см. раздел 5.2 данного обзора) клиническое использование КТ в качестве контрастирующих агентов для визуализации *in vivo* сопряжено с определенными трудностями. В то же время исключительная яркость, высокий квантовый выход, а также большое сечение двухфотонного поглощения, определяющее яркость флуорофора в многофотонной микроскопии позволяют успешно использовать КТ как надежные визуализирующие агенты для изучения анатомии и патофизиологии опухолей на животных моделях. Применение КТ значительно усиливает существующие методы прижизненной микроскопии опухолей и их микроокружения. Комбинация исключительных спектральных свойств КТ и современных технологий, позволяющих получать изображения *in vivo* с высоким разрешением, может привести к существенному прорыву в понимании биологии опухолей.

4.2 Биораспределение и фармакокинетика КТ

Решающими факторами для успеха диагностики опухолей *in vivo* являются высокое содержание флуорофора в опухоли по сравнению с его содержанием в нормальных тканях и крови, а также отсутствие ложноположительных сигналов. Кроме того, диагностические агенты должны быстро выводиться из организма.

В исследованиях *in vitro* было показано, что поведение и судьба КТ в клетке зависят в значительной степени от размера и химических свойств поверхности этих частиц [88, 89]. Предполагалось, что эти же параметры будут играть важную роль и в распределении КТ в организме.

При изучении биораспределения КТ в организме модельных животных оказалось, что все КТ полно-

стью удаляются из кровотока и аккумулируются в органах и тканях [90], прежде всего в органах РЭС (печени, селезенке и лимфоузлах). Аналогичные результаты были получены при визуализации опухолей: наряду с накоплением метки в опухоли часть КТ задерживалась также в органах РЭС [25, 31, 32, 53, 65]. В тканях легких, сердца, мышц и мозга КТ почти во всех случаях обнаружено не было, в некоторых работах наблюдали небольшое содержание КТ в почках. Причем, что неожиданно, такое распределение не зависело от свойств поверхности и вида конъюгированного с КТ направляющего агента (или отсутствия такового), а наличие ПЭГ на поверхности частиц лишь немного увеличивало время циркуляции в крови, но не исключало полностью накопления в этих органах. Время полувыведения КТ из кровотока варьировало от нескольких минут до нескольких десятков часов и сильно зависело от их гидродинамического диаметра [91], а также от заряда и структуры поверхности [92].

В этом контексте интересна работа, в которой было проведено прямое сравнение КТ и стандартного органического красителя Alexa Fluor 680, конъюгированных с анти-IGF1R-антителами в экспериментах на модельных животных *in vivo* [55]. Было показано, что оба флуорофора позволяют специфически визуализировать опухоль молочной железы, однако КТ существенно хуже выводятся из организма, накапливаясь в органах РЭС.

Первоначальные результаты работ, посвященных исследованию влияния размера и свойств поверхности КТ на их распределение в организме после внутривенного введения, довольно противоречивы. Так, в ряде исследований было показано, что поверхностное покрытие [93, 94] и размер [94] сильно влияют на фармакокинетику и биораспределение частиц. С другой стороны, в систематическом исследовании [95], проведенном с одновременным учетом всех факторов, которые могут влиять на биораспределение, не наблюдалось каких-либо значимых различий между КТ разного размера, с разным зарядом и наличием или отсутствием на поверхности различных молекул (альбумин, ПЭГ) – все КТ накапливались в первую очередь в печени и селезенке.

КТ могут выводиться из организма двумя путями: через почки и через печень [93, 96]. Путь выведения в наибольшей степени зависит от двух параметров частиц: размера и поверхностного покрытия, определяющего склонность к адсорбции белков сыворотки крови [78]. Изучение выведения из организма специально созданных серий КТ различного размера и с различным покрытием [59] показало, что одним из обязательных критериев для полного выведения наночастиц из организма через почки является зна-

чение гидродинамического диаметра КТ менее 5.5 нм (т.е. ниже порога почечной фильтрации). На сегодняшний день все синтезированные КТ с флуоресценцией в красном и ближнем ИК-диапазоне, используемые для визуализации *in vivo*, имеют больший размер (около 10 нм) и в принципе не могут выводиться через почки. Кроме того, эти КТ покрыты полимером для лучшей стабильности и содержат на поверхности заряженные функциональные группы и ПЭГ, что еще больше увеличивает их размер. Так, например, гидродинамический диаметр широко используемых коммерческих КТ производства Invitrogen – 15–19 нм [82]. Для таких больших небиодegradуемых КТ остается только один путь выведения из организма – через печень, в составе желчи. Это очень медленный и неэффективный процесс, а длительное пребывание наночастиц в органах РЭС повышает возможность разрушения оболочки КТ и возникновения токсического эффекта. Таким образом, для КТ, идеально подходящих по своим прочим характеристикам для визуализации опухолей *in vivo*, накопление в печени, селезенке и других органах РЭС неизбежно. Интересно, что некоторые авторы отмечали в почках накопление КТ с гидродинамическим диаметром, значительно превышающим порог почечной фильтрации [95, 97]. Без проведения дополнительных исследований трудно сказать, являются ли приведенные данные артефактом или свидетельствуют о каких-то, еще не изученных механизмах взаимодействия наночастиц с живым организмом. В любом случае, затрудненное выведение из организма остается одним из основных препятствий для применения КТ в организме человека.

5. РИСК ПРИМЕНЕНИЯ КТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Уникальные физико-химические свойства КТ делают их чрезвычайно привлекательными флуорофорами для визуализации живых объектов *in vivo*. Пионерские работы в этой области появились сравнительно недавно (менее 10 лет назад), и поиск оптимального для этих целей дизайна КТ ведется до сих пор. В связи с этим КТ, используемые отдельными лабораториями, сильно различаются по таким параметрам, как размер, форма, заряд, концентрация, окислительно-восстановительные свойства, поверхностное покрытие и физическая стабильность. Широкий диапазон этих параметров, а также различные условия экспериментов (время обработки, выбор модельных клеточных линий и среды, употребление одинаковых единиц концентрации, наличие или отсутствие направляющего агента) сильно затрудняют сравнение литературных данных о био-

безопасности КТ и составление общей картины. Однако среди крайне разнообразной и противоречивой информации все же был выявлен ряд закономерностей [90, 98].

5.1 Цитотоксичность КТ

Цитотоксическое действие КТ определяется в основном четырьмя факторами: наличием в их составе ионов тяжелых металлов, способностью генерировать активные формы кислорода (АФК), коллоидной нестабильностью и неспецифическим взаимодействием с биологическими молекулами [90, 98].

КТ первого поколения, состоящие только из флуоресцентного ядра (CdTe или CdSe) и стабилизированные тиоловыми лигандами (например, цистеином или МУК), легко подвергаются окислению и деградации с высвобождением токсичных ионов кадмия [99], а также способны индуцировать образование АФК [100]. Такие частицы чрезвычайно токсичны для клеток в культуре даже в небольших концентрациях и поэтому непригодны для исследований на живых объектах.

КТ второго поколения снабжены оболочкой из инертного сульфида цинка для предотвращения безызлучательной диссипации энергии. Кроме того, как оказалось, такая оболочка препятствует окислению и деградации флуоресцентного ядра и высвобождению ионов кадмия, что значительно снижает цитотоксичность. В то же время для КТ, стабилизированных дешевым и простым методом с использованием небольших тиоловых лигандов, характерна недостаточная коллоидная стабильность [99]. Осаждение агрегатов таких КТ на поверхности клеток, даже без проникновения внутрь, может вызывать физические повреждения, нарушение функционирования и, в конечном итоге, смерть клетки [89]. КТ второго поколения в принципе применимы для кратковременных исследований на культуре клеток, но существует большой риск при их использовании в организме.

В настоящее время в большинстве биологических исследований применяют КТ третьего поколения – CdSe/ZnS-частицы, окруженные полимерной или силиконовой оболочкой. Эти КТ гораздо более стабильны коллоидно, химически и оптически по сравнению с их аналогами, покрытыми небольшими лигандами. КТ третьего поколения проявляют некоторую токсичность в культуре клеток лишь в экстремальных условиях или при использовании в концентрациях, на порядок превышающих необходимую для окрашивания и визуализации клеточных мишеней [89, 101]. Такие КТ являются наиболее перспективными для применения в организме. Однако при их конструировании необходимо учитывать, что КТ – не молекулы, а на-

ночастицы, и для них, так же как и для других наночастиц, более важным для проявления токсичности является не состав, а физико-химические свойства поверхности. Некоторые биоинертные наночастицы (золотые, углеродные) оказывают на клетки такое же токсическое воздействие, как и КТ. Например, золотые наночастицы и КТ, покрытые одной и той же оболочкой из амфифильных полимеров, одинаково вызвали физические повреждения клеток молочной железы в культуре и индуцировали их открепление от подложки [89]. Таким образом, хотя дополнительное вторичное устойчивое покрытие предотвращает окисление и деградацию КТ, оно само может вносить вклад в общую токсичность частиц [102].

Суммируя вышеизложенное, следует отметить, что с момента создания первых коллоидных КТ для биологического применения проделана большая работа по снижению их токсичности, в основном благодаря использованию различных покрытий, и создан задел для их применения *in vivo*.

5.2 Системная токсичность *in vivo*

Исследование цитотоксичности *in vitro* является важным и необходимым этапом разработки агентов для диагностики и терапии на основе КТ, поскольку позволяет ускорить и стандартизировать процесс отбора наиболее подходящих по всем параметрам частиц для применения *in vivo*. Однако для внедрения КТ в клиническую практику таких исследований, как правило, недостаточно. При использовании КТ для визуализации в организме необходимо наряду с коллоидной природой и физико-химическими свойствами поверхности этих частиц дополнительно учитывать их взаимодействие с иммунной системой, а также возможность физико-химического разрушения в условиях агрессивных сред организма с высвобождением токсичных элементов из их флуоресцентного ядра.

К настоящему моменту получены данные по взаимодействию с иммунной системой некоторых типов наночастиц (липосомных, углеродных, золотых, магнитных) [103]. Показано, что после введения в кровь наночастицы быстро подвергаются опсонизации и последующему фагоцитозу клетками иммунной системы. Кроме того, их введение в кровь может вызвать агрегацию тромбоцитов, активацию системы комплемента и стимуляцию или подавление иммунной системы [103]. В отношении КТ экспериментальные данные по этой теме пока практически отсутствуют. Можно было предположить, что взаимодействие КТ с иммунной системой аналогично взаимодействию, характерному для других наночастиц. Действительно, в работе японских авторов [104] показано, что как *in vitro*, так и *in vivo* КТ не вызывают увели-

чения цитокиновой продукции CD4⁺Т-лимфоцитами, но стимулируют пролиферацию клеток иммунной системы.

Данные первого систематического исследования токсичности и биораспределения КТ в организме были опубликованы совсем недавно [95]. На крысиных моделях были изучены кратковременные (до 7 дней) и отдаленные (более 80 дней) биологические эффекты КТ с разным полимерным покрытием. Были проведены стандартные клинические биохимические и гематологические тесты, а также гистологические исследования органов. Вопреки ожиданиям, после внутривенного введения КТ, содержащих на поверхности карбоксильные группы, ПЭГ или бычий сывороточный альбумин, в суммарной дозе 60 нмоль/животное, введенной в течение четырех недель, ни для одного из вариантов частиц выраженной токсичности отмечено не было.

Исследователи, изучающие биораспределение КТ в организме и возможность визуализации опухолей *in vivo*, также неоднократно отмечали отсутствие во время эксперимента признаков острой токсичности у животных, отсутствие некрозов и сохранение морфологии тканей [86, 93, 96]. Однако возможность накопления и дегградации КТ в организме не исключает их скрытой токсичности и отложенного действия.

Стабильность КТ внутри тканей и органов РЭС вызывает споры. Некоторые авторы показали, что КТ, покрытые полимером, сохраняют свою морфологию и флуоресцентные свойства в тканях в течение длительного времени (до 4 месяцев), не подвергаясь разрушению с высвобождением потенциально токсичных составляющих элементов [96, 97]. В то же время в некоторых случаях была отмечена дегградация таких частиц в организме, ведущая к изменению флуоресценции [53]. Этот процесс кажется вполне возможным, поскольку в экспериментах *in vitro* показано, что некоторые источники АФК, такие, как пероксид водорода и хлорноватистая кислота, которые всегда присутствуют в клетке в небольших количествах, могут проникать через полимерную оболочку и вызывать дегградацию флуоресцентного ядра [105]. Возможно также, что разрушению в организме подвергается лишь часть КТ, а часть остается интактной, и соотношение этих частей – вопрос времени (месяцев и даже лет) [95].

Таким образом, явной токсичности КТ в модельных организмах показано не было. Однако наличие многочисленных факторов риска, недостаток данных, а также отсутствие долговременных исследований не позволяют сделать окончательного заключения о безопасности применения КТ для организма. Некоторые отрывочные и противоречивые сведения

о токсичности КТ, встречающиеся в работах, посвященных биораспределению этих наночастиц, лишь подчеркивают необходимость полномасштабных исследований, затрагивающих различные системы органов, для адекватной оценки риска использования КТ *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Квантовые точки – это относительно новый класс соединений, обладающий большим потенциалом для применения в разных видах диагностики опухолей от определения онкомаркеров на микропланшете до неинвазивной визуализации опухолей *in vivo*. Уникальные физико-химические свойства КТ: легко настраиваемые спектры флуоресценции, высокий квантовый выход (особенно в ИК-области), возможность возбуждения в широком диапазоне длин волн и узкие пики флуоресценции, большое сечение двухфотонного поглощения, устойчивость к фотовыцветанию, – позволяют существенно расширить возможности современных методов флуоресцентной визуализации и оптической диагностики. Эти флуорофоры позволяют решать задачи, трудно осуществимые с помощью традиционных красителей: например, проводить одновременную детекцию нескольких маркеров, длительные наблюдения за молекулярными процессами в реальном времени и получать изображения новообразований в глубине тканей. В то же время для ряда рутинных задач проблемы, связанные с коллоидной природой КТ, значительно перевешивают преимущества их оптических свойств.

Относительно большая площадь поверхности КТ, доступная для химической модификации, и возможность присоединения других молекул и частиц также позволяют получать на основе КТ разнообразные мультимодальные конструкции, содержащие наряду с КТ частицы другой природы (золотые, магнитные, алмазные, липосомные и др.) (рис. 3) [28, 106] и обладающие одновременно направляющими, диагностическими и терапевтическими свойствами [107]. Подобные многофункциональные наноустройства предназначены для одновременной доставки действующего агента к опухоли и слежения за этим процессом [35, 62]. Дальнейшая оптимизация биосовместимых КТ будет способствовать развитию таких инновационных подходов в онкологии, как хирургическое вмешательство под контролем навигационных систем (*англ.* image-guided surgery), определение молекулярного профиля опухоли, персонализированная диагностика и терапия [108].

Успех реализации большого потенциала КТ и широкое внедрение его в диагностику *in vivo* зависят от решения следующих насущных задач. Прежде

всего, это проведение долговременных токсикологических исследований и тщательное изучение отложенного эффекта введения КТ. К настоящему моменту уже разработаны покрытия на основе полимерных материалов [109], которые значительно увеличили биоинертность КТ и существенно снизили их токсичность, однако из-за накопления КТ в органах ретикулоэндотелиальной системы и медленного выведения из организма безопасность их применения в живом организме остается предметом изучения. В связи с этим можно сформулировать и две другие задачи – необходимость разработки нового поколения КТ, быстро выводящихся из организма, а также изучение последствий возможного поступления КТ в окружающую среду и обеспечение экологической безопасности при их широком применении. Решение

этих задач, возможно, будет связано с появлением новых материалов и технологий для конструирования флуоресцентных наночастиц. ●

Работы лаборатории С.М. Деева по конструированию олигомерных надмолекулярных комплексов для диагностики и терапии рака, в том числе с использованием КТ, поддержаны грантом РФФИ 09-04-01201-а, ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы», Программами Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Giepmans B.N., Adams S.R., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // *Science*. 2006. V. 312. № 5771. P. 217–224.
- Chudakov D.M., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Trends Biotechnol.* 2005. V. 23. № 12. P. 605–613.
- Shcherbo D., Murphy C.S., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Chepurnykh T.V., Shcheglov A.S., Verkhusha V.V., Pletnev V.Z., Hazelwood K.L., Roche P.M., Lukyanov S., Zaraisky A.G., Davidson M.W., Chudakov D.M. // *Biochem. J.* 2009. V. 418. № 3. P. 567–754.
- Wang C., Gao X., Su X. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 397. № 4. P. 1397–1415.
- Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. // *Российские нанотехнологии*. 2007. Т. 2. № 1–2. С. 160–173.
- Resh-Genger U., Grabolle M., Cavaliere-Jaricot S., Nitschke R., Nann T. // *Nat. Methods*. 2008. V. 5. № 9. P. 763–775.
- Alivisatos P. // *Nature Biotechnol.* 2004. V. 22. № 1. P. 47–52.
- Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Mattoussi H. // *Nat. Mater.* 2005. V. 4. № 6. P. 435–446.
- Dabbousi B.O., Rodriguez-Viejo J., Mikulec F.V., Heine J.R., Mattoussi H., Ober R., Jensen K. F., Bawendi M.G. // *J. Phys. Chem. B*. 1997. V. 101. № 46. P. 9463–9475.
- Parak W.J., Gerion D., Pellegrino T., Zanchet D., Micheel C., Williams S.C., Alivisatos A.P., Boudreau R., Le Gros M.A., Larabell C.A. // *Nanotech.* 2003. V. 14. № 7. R15–R27. doi: 10.1088/0957-4484/14/7/201.
- Lidke D.S., Nagy P., Heintzmann R., Arndt-Jovin D.J., Post J.N., Grecco H.E., Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 2. P. 198–203.
- Dahan M., Levi S., Luccardini C., Rostaing P., Riveau B., Triller A. // *Science*. 2003. V. 302. № 5644. P. 442–445.
- Tholouli E., Hoyland J.A., Di Vizio D., O'Connell F., Macdermott S.A., Twomey D., Levenson R., Yin J.A., Golub T.R., Loda M., Byers R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 348. № 2. P. 628–636.
- Chan W.C., Nie S. // *Science*. 1998. V. 281. № 5385. P. 2016–2018.
- Bruchez M.Jr., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A.P. // *Science*. 1998. V. 281. № 5385. P. 2013–2016.
- Wu M.X., Liu H., Haley K.N., Treadway J.A., Larson J.P., Ge N., Peale F., Bruchez M. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 1. P. 41–46.
- Smith A.M., Dave S., Nie S., True L., Gao X. // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006. V. 6. № 2. P. 231–244.
- Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 1. С. 32–50.
- Bird R.E., Hardman K.D., Jacobson J.W., Johnson S., Kaufman B.M., Lee S.M., Lee T., Pope S.H., Riordan G.S., Whitlow M. // *Science*. 1988. V. 242. № 4877. P. 423–426.
- Pack P., Plückthun A. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. № 6. P. 1579–1584.
- Wu A.M., Yazaki P.J. // *Q. J. Nucl. Med.* 2000. V. 44. № 3. P. 268–283.
- Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L., Lutsenko G.V., Leonova O.G., Popenko V.I., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *PLoS ONE*. 2008. V. 3. № 6. P. e2434.
- Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *Invest. New Drugs*. 2009. DOI 10.1007/s10637-009-9329-2.
- Serebrovskaya E.O., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Deyev S.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 23. P. 9221–9225.
- Yang L., Mao H., Wang Y.A., Cao Z., Peng X., Wang X., Duan H., Ni C., Yuan Q., Adams G., Smith M.Q., Wood W.C., Gao X., Nie S. // *Small*. 2009. V. 5. № 2. P. 235–243.
- Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 12. P. 1486–1492.
- Deyev S.M., Lebedenko E.N. // *Bioessays*. 2008. V. 30. № 9. P. 904–918.
- Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 13. P. 5827–5832.
- Zhou M., Ghosh I. // *Biopolymers*. 2007. V. 88. № 3. P. 325–339.
- Winter J.O., Liu T.Y., Korgel B.A., Schmidt C.E. // *Adv. Mater.* 2001. V. 13. № 22. P. 1673–1677.
- Akerman M.E., Chan W.C., Laakkonen P., Bhatia S.N., Ruoslahti E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 20. P. 12617–12621.
- Cai W., Shin D.W., Chen K., Gheysens O., Cao Q., Wang S.X., Gambhir S.S., Chen X. // *Nano Lett.* 2006. V. 6. № 4. P. 669–676.
- Zhang J., Jia X., Lv X.J., Deng Y.L., Xie H.Y. // *Talanta*. 2010. V. 81. № 1–2. P. 505–509.

34. Chu T.C., Shieh F., Lavery L.A., Levy M., Kortum R.R., Korgel B.A., Ellington A.D. // *Biosens. Bioelectron.* 2006. V. 21. № 10. P. 1859–1866.
35. Bagalkot V., Zhang L., Levy-Nissenbaum E., Jon S., Kantoff P.W., Langer R., Farokhzad O.C. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. № 10. P. 3065–3070.
36. Ko M.H., Kim S., Kang W.J., Lee J.H., Kang H., Moon S.H., Hwang D.W., Ko H.Y., Lee D.S. // *Small.* 2009. V. 5. № 10. P. 1207–1212.
37. Smith A.M., Duan H., Mohs A.M., Nie S. // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2008. V. 60. № 11. P. 1226–1240.
38. Chan W.C., Maxwell D.J., Gao X., Bailey R.E., Han M., Nie S. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. V. 13. № 1. P. 40–46.
39. Pathak S., Davidson M.C., Silva G.A. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. № 7. P. 1839–1845.
40. Green N.M. // *Methods Enzymol.* 1990. V. 184. P. 51–67.
41. Dahan M. // *Histochem. Cell Biol.* 2006. V. 125. № 5. P. 451–456.
42. Лебеденко Е.Н., Баландин Т.Г., Эдельвейс Э.Ф., Георгиев О., Моисеева Е.С., Петров Р.В., Деев С.М. // *ДАН.* 2007. Т. 414. № 3. С. 408–411.
43. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // *Биоорган. химия.* 2009. Т. 35. № 6. С. 761–778.
44. Martsev S.P., Tsybovsky Y.I., Stremovskiy O.A., Odintsov S.G., Balandin T.G., Arosio P., Kravchuk Z.I., Deyev S.M. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2004. V. 17. № 1. P. 85–93.
45. Zdobnova T.A., Dorofeev S.G., Tananaev P.N., Vasiliev R.B., Balandin T.G., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Balalaeva I.V., Turchin I.V., Lebedenko E.N., Zlomanov V.P., Deyev S.M. // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14. № 2. P. 021004.
46. Здобнова Т.А., Дорофеев С.Г., Тананаев П.Н., Зломанов В.П., Стрёмовский О.А., Лебеденко Е.Н., Балалаева И.В., Деев С.М., Петров Р.В. // *ДАН.* 2010. Т. 430. № 5. С. 705–708.
47. Bentzen E.L., Tomlinson I.D., Mason J., Gresch P., Warnelement M.R., Wright D., Sanders-Bush E., Blakely R., Rosenthal S.J. // *Bioconjug. Chem.* 2005. V. 16. № 6. P. 1488–1494.
48. Duan H., Nie S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. № 11. P. 3333–3338.
49. Беляева Т.Н., Салова А.В., Леонтьева Е.А., Моженок Т.П., Корнилова Е.С., Кроленко С.А. // *Цитология.* 2009. Т. 51. № 10. С. 830–836.
50. Kelf T.A., Sreenivasan V.K., Sun J., Kim E.J., Goldys E.M., Zvyagin A.V. // *Nanotechnology.* 2010. V. 21. № 28. e285105.
51. Xing Y., Chaudry Q., Shen C., Kong K.Y., Zhou H.E., Chung L.W., Petros J.A., O'Regan R.M., Yezhelyev M.V., Simons J.W., Wang M.D., Nie S.M. // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. № 5. P. 1152–1165.
52. Kairdolf B.A., Mancini M.C., Smith A.M., Nie S. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. № 8. P. 3029–3034.
53. Gao X., Cui Y., Levenson R.M., Chung L.W., Nie S. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 8. P. 969–976.
54. Tada H., Higuchi T.M., Wanatabe N., Ohuchi N. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 3. P. 1138–1144.
55. Zhang H., Sachdev D., Wang C., Hubel A., Gaillard-Kelly M., Yee D. // *Breast Cancer Res Treat.* 2009. V. 114. № 2. P. 277–285.
56. Yong K.-T., Ding H., Roy I., Law W.-C., Bergey E.J., Maitra A., Prasad P.N. // *ACS Nano.* 2009. V. 3. № 3. P. 502–510.
57. Li Z., Wang K., Tan W., Li J., Fu Z., Ma C., Li H., He X., Liu J. // *Anal. Biochem.* 2006. V. 354. № 2. P. 169–174.
58. Shi C., Zhu Y., Xie Z., Qian W., Hsieh C.L., Nie S., Su Y., Zhou H.E., Chung L.W. // *Urology.* 2009. V. 74. № 2. P. 446–451.
59. Choi H.S., Liu W., Liu F., Nasr K., Misra P., Bawendi M.G., Frangioni J.V. // *Nat. Nanotechnol.* 2010. V. 5. № 1. P. 42–47.
60. Sukhanova A., Devy J., Venteo L., Kaplan H., Artemyev M., Oleinikov V., Klinov D., Pluot M., Cohen J.H., Nabiev I. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 324. № 1. P. 60–67.
61. Yezhelyev M.V., Al-Hajj A., Morris C., Marcus A.I., Liu T., Lewis M., Cohen C., Zrazhevskiy P., Simons J.W., Rogatko A., Nie S., Gao X., O'Regan R.M. // *Adv. Mater.* 2007. V. 19. № 20. P. 3146–3151.
62. Weng K.C., Noble C.O., Papahadjopoulos-Sternberg B., Chen F.F., Drummond D.C., Kirpotin D.B., Wang D., Hom Y.K., Hann B., Park J.W. // *Nano Lett.* 2008. V. 8. № 9. P. 2851–2857.
63. Takeda M., Tada H., Higuchi H., Kobayashi Y., Kobayashi M., Sakurai Y., Ishida T., Ohuchi N. // *Breast Cancer.* 2008. V. 15. № 2. P. 145–152.
64. Yu X., Chen L.D., Li K.Y., Li Y., Xiao S., Luo X., Liu J., Zhou L., Deng Y.L., Pang D.W., Wang Q.Q. // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12. № 1. P. 014008.
65. Chen L.D., Liu J., Yu X.F., He M., Pei X.F., Tang Z.Y., Wang Q.Q., Pang D.W., Li Y. // *Biomaterials.* 2008. V. 29. № 31. P. 4170–4176.
66. Diagaradjane P., Orenstein-Cardona J.M., Colón-Casasnovas N.E., Deorukhkar A., Shentu S., Kuno N., Schwartz D.L., Gelovani J.G., Krishnan S. // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 14. № 3. P. 731–741.
67. Jaiswal J.K., Mattoussi H., Mauro J.M., Simon S.M. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 1. P. 47–51.
68. Kawashima N., Nakayama K., Itoh K., Itoh T., Ishikawa M., Biju V. // *Chemistry.* 2010. V. 16. № 4. P. 1186–1192.
69. Bharali D.J., Lucey D.W., Jayakumar H., Pudavar H.E., Prasad P.N. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. № 32. P. 11364–11371.
70. Goldman E.R., Clapp A.R., Anderson G.P., Uyeda H.T., Mauro J.M., Medintz I.L., Mattoussi H. // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. № 3. P. 684–688.
71. Makrides S.C., Gasbarro C., Bello J.M. // *Biotechniques.* 2005. V. 39. № 4. P. 501–506.
72. Rousserie G., Sukhanova A., Even-Desrumeaux K., Fleury F., Chames P., Baty D., Oleinikov V., Pluot M., Cohen J.H., Nabiev I. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2010. V. 74. № 1. P. 1–15.
73. Estrada C.R., Salanga M., Bielenberg D.R., Harrell W.B., Zurakowski D., Zhu X., Palmer M.R., Freeman M.R., Adam R.M. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 6. P. 3078–3086.
74. Chen C., Peng J., Xia H., Yang G., Wu Q., Chen L., Zeng L., Zhang Z., Pang D., Li Y. // *Biomaterials.* 2009. V. 30. № 15. P. 2912–2918.
75. Fountaine T.J., Wincovitch S.M., Geho D.H., Gargield S.H., Pittaluga S. // *Mod. Pathol.* 2006. V. 19. № 9. P. 1181–1191.
76. Bouzigues C., Lévi S., Triller A., Dahan M. // *Methods Mol. Biol.* 2007. V. 374. P. 81–91.
77. Parak W.J., Boudreau R., Gros M.L., Gerion D., Zanchet D., Micheel C.M., Williams S.C., Alivisatos A.P., Larabell C.A. // *Adv. Mater.* 2002. V. 14. № 12. P. 882–885.
78. Frangioni J.V. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003. V. 7. № 5. P. 626–634.
79. Jain R.K. // *J. Control. Release.* 2001. V. 74. № 1–2. P. 7–25.
80. Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K. // *J. Control. Release.* 2000. V. 65. № 1–2. P. 271–284.
81. Mahmoud W., Sukhanova A., Oleinikov V., Rakovich Y.P., Donegan J.F., Pluot M., Cohen J.H., Volkov Y., Nabiev I. // *Proteomics.* 2010. V. 10. № 4. P. 700–716.
82. Kobayashi H., Hama Y., Koyama Y., Barrett T., Regino C.A., Urano Y., Choyke P.L. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. № 6. P. 1711–1716.
83. Luciani A., Itti E., Rahmouni A., Meignan M., Clement O. // *Eur. J. Radiol.* 2006. V. 58. № 3. P. 338–344.

84. Ravizzini G., Turkbey B., Barrett T., Kobayashi H., Choyke P.L. // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2009. V. 1. № 6. P. 610–623.
85. Kim S., Lim Y.T., Soltesz E.G., De Grand A.M., Lee J., Nakayama A., Parker J.A., Mihaljevic T., Laurence R.G., Dor D.M., Cohn L.H., Bawendi M.G., Frangioni J.V. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 1. P. 93–97.
86. Larson D.R., Zipfel W.R., Williams R.M., Clark S.W., Bruchez M.P., Wise F.W., Webb W.W. // *Science.* 2003. V. 300. № 5624. P. 1434–1436.
87. Stroh M., Zimmer J.P., Duda D.G., Levchenko T.S., Cohen K.S., Brown E.B., Scadden D.T., Torchilin V.P., Bawendi M.G., Fukumura D., Jain R.K. // *Nat. Med.* 2005. V. 11. № 6. P. 678–682.
88. Lovric J., Cho S.J., Winnik F.M., Maysinger D. // *Chem. Biol.* 2005. V. 12. № 11. P. 1227–1234.
89. Kirchner C., Liedl T., Kudera S., Pellegrino T., Javier A.M., Gaub H.E., Stolzle S., Fertig N., Parak W.J. // *Nano Lett.* 2005. V. 5. № 2. P. 331–338.
90. Pelley J.L., Daar A.S., Saner M.A. // *Toxicol. Sci.* 2009. V. 112. № 2. P. 276–296.
91. Choi H.S., Liu W., Misra P., Tanaka E., Zimmer J.P., Ito Ipe B., Bawendi M.G., Frangioni J.V. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. № 10. P. 1165–1170.
92. Campbell R.B., Fukumura D., Brown E.B., Mazzola L.M., Izumi Y., Jain R.K., Torchilin V.P., Munn L.L. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. № 23. P. 6831–6836.
93. Fischer H., Liu L., Pang K.S., Chan W. // *Adv. Funct. Mater.* 2006. № 10. V. 16. P. 1299–1305.
94. Schipper M.L., Iyer G., Koh A.L., Cheng Z., Ebenstein Y., Aharoni A., Keren S., Bentolila L.A., Li J., Rao J., Chen X., Babin U., Wu A.M., Sinclair R., Weiss S., Gambhir S.S. // *Small.* 2009. V. 5. № 1. P. 126–134.
95. Hauck T.S., Anderson R.E., Fischer H.C., Newbigging S., Chan W.C. // *Small.* 2010. № 1. V. 6. P. 138–144.
96. Ballou B., Lagerholm B.C., Ernst L.A., Bruchez M.P., Waggoner A.S. // *Bioconjug. Chem.* 2004. V. 15. № 1. P. 79–86.
97. Yang R.H., Chang L.W., Wu J.P. // *Environ. Health. Perspect.* 2007. V. 115. № 9. P. 1339–1343.
98. Hardman R. // *Environ. Health Perspect.* 2006. V. 114. № 2. P. 165–172.
99. Aldana J., Wang Y.A., Peng X. // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. № 36. P. 8844–8850.
100. Haram S.K., Quinn B.M., Bard A.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. № 36. P. 8860–8861.
101. Zhang T., Stilwell J.L., Gerion D., Ding L., Elboudwarej O., Cooke P.A., Gray J.W., Alivisatos A.P., Chen F.F. // *Nano Lett.* 2006. V. 6. № 4. P. 800–808.
102. Rzigalinski B.A., Strobl J.S. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009. V. 238. № 3. P. 280–288.
103. Dobrovolskaia M.A., McNeil S.E. // *Nat. Nanotechnol.* 2007. V. 2. № 8. P. 469–478.
104. Hoshino A., Hanada S., Manabe N., Nakayama T., Yamamoto K. // *IEEE Trans. Nanobioscience.* 2009. V. 8. № 1. P. 51–57.
105. Mancini M.C., Kairdolf B.A., Smith A.M., Nie S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. № 33. P. 10836–10837.
106. Kim J., Piao Y., Hyeon T. // *Chem. Soc. Rev.* 2009. V. 38. № 2. P. 372–390.
107. Biju V., Mundayoor S., Omkumar R.V., Anas A., Ishikawa M. // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 28. № 2. P. 199–213.
108. Zrazhevskiy P., Gao X. // *Nano Today.* 2009. V. 4. № 5. P. 414–428.
109. Generalova A.N., Sizova S.V., Zdobnova T.A., Zarifullina M.M., Artemyev M.V., Baranov A.V., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Deyev S.M. // *Nanomedicine.* 2011. V. 6. № 2. P. 195–209.

УДК 576.316.24

Теломераза: методы определения активности

Д. А. Скворцов*, М. Э. Зверева, О. В. Шпанченко, О. А. Донцова

Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ

*E-mail: skvorratd@mail.ru

Поступила в редакцию 02.11.2010 г.

РЕФЕРАТ Укорачивание концов хромосом (теломер), обусловленное полуконсервативным механизмом репликации ДНК, определяет возможное число делений клетки, играя роль «клеточных часов». Теломераза удлинит одну из цепей теломеры, компенсируя ее укорачивание, поэтому теломеразная активность служит маркером пролиферативной активности клеток. В подавляющем большинстве нормальных клеток человека теломераза неактивна, в отличие от эмбриональных тканей, стволовых клеток и репродуктивных органов. Теломераза активируется в большинстве злокачественных опухолей, что можно использовать для диагностики неопластической трансформации. Поэтому разработка методов определения теломеразной активности привлекает внимание исследователей. Тестирование теломеразной активности необходимо при поиске ингибиторов теломеразы – потенциальных противоопухолевых средств. Кроме того, активация теломеразы может играть положительную роль при регенерации тканей, к примеру, после частичного удаления печени или инфаркта миокарда.

Все методы определения активности теломеразы можно разделить на две большие группы: методы, основанные на прямом определении синтезированной теломеразой ДНК, и методы, использующие различные схемы усиления сигнала от ДНК, созданной теломеразой. Рассмотренные в представленном обзоре методы пригодны для тестирования теломеразной активности в клетках простейших, отдельных клетках клеточных линий, смешанных клеточных популяциях и тканях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА теломераза, методы определения активности, онкодиагностика, физико-химические методы, определение ДНК.

ЧТО ТАКОЕ ТЕЛОМЕРАЗА И ЗАЧЕМ ОПРЕДЕЛЯТЬ ЕЕ АКТИВНОСТЬ

В 1961 г. Хейфлик и Мурхиад показали, что культура соматических клеток имеет ограниченный период жизни (предел Хейфлика) [1]. В 1973 г. Оловников предположил, что возможное число делений клетки определяется укорачиванием концов хромосом – теломер [2], играющих роль «клеточных часов». Теломеры защищают геном клетки от деградации, участвуют в мейотическом спаривании хромосом и регуляции транскрипции генов прителомерной области [3, 4]. В клетках, способных размножаться бесконечно (бессмертных), существует механизм, компенсирующий укорачивание теломер. В 1985 г. Блекберн и Грейдер открыли теломеразу – фермент, удлиняющий одну из цепей теломеры [5].

Теломераза представляет собой РНК-белковый комплекс, основные компоненты которого – РНК-матрица для синтеза теломер (TERC), выполняющая также структурную функцию, и обратная транскриптаза (TERT) [6]. Теломеразный комплекс

(теломераза) связывается с теломерой или олигонуклеотидом, последовательность которого может не совпадать с теломерной последовательностью (теломеримитирующий олигонуклеотид), и синтезирует короткий фрагмент ДНК (GTTAGG у млекопитающих). Затем теломераза передвигается на конец теломеры (транслокация) и вновь синтезирует фрагмент ДНК (рис. 1). Активность теломеразы пропорциональна общему количеству синтезированной ею ДНК, а процессивность пропорциональна длине синтезированных фрагментов.

Теломеразная активность служит маркером пролиферативной активности клеток. Компоненты теломеразы могут выполнять функции, не зависящие от сборки активного комплекса. Например, hTERT (TERT человека) независимо от присутствия hTERC (TERC человека) может работать как РНК-зависимая РНК-полимераза [7]. Повышение экспрессии hTERC не всегда совпадает с появлением теломеразной активности [8]. hTERC ингибирует протеинкиназу ATR, мишенями которой являются

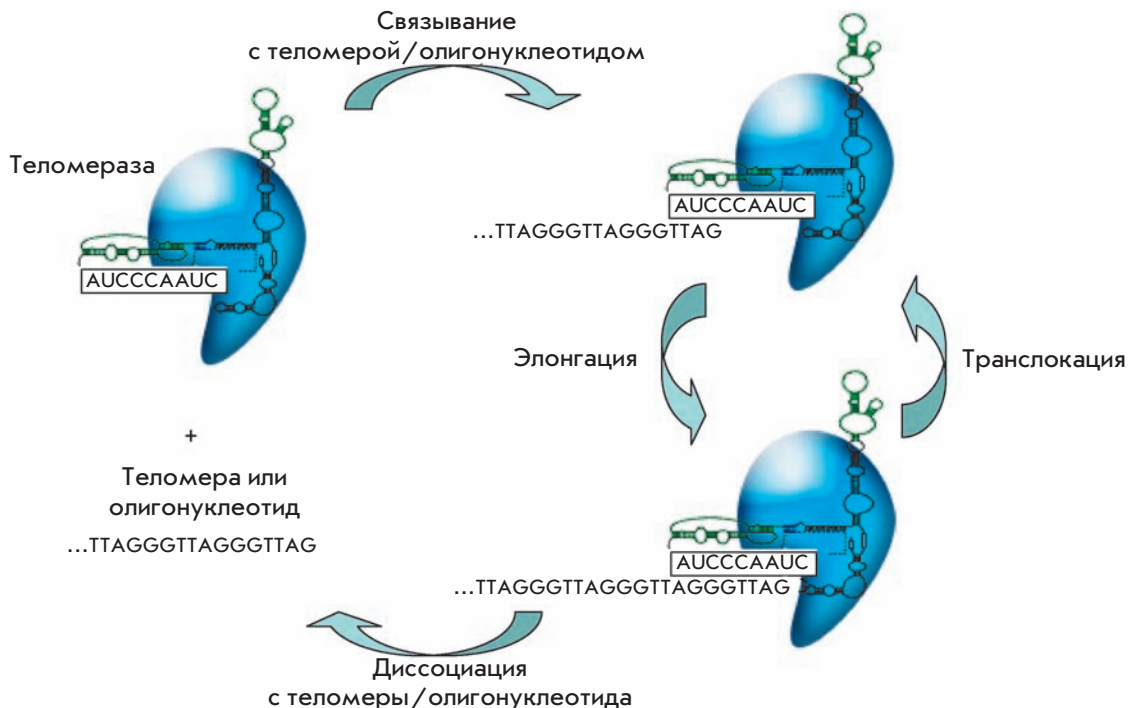


Рис. 1. Общая схема работы теломеразного комплекса.

известный супрессор опухолевого роста p53 и протеинкиназа контрольных точек CHK1, входящая в систему проведения сигналов от поврежденной ДНК. Снижение уровня hTERT приводит к остановке клеточного цикла в фазах G1 и G2 в результате активации белка p53 и протеинкиназы CHK1, но механизм этого остается неизвестным [9].

Активность теломеразы не выявляется в подавляющем большинстве нормальных клеток человека, но присутствует в репродуктивных органах и эмбриональных тканях. Этот фермент активен в стволовых клетках и некоторых быстро обновля-

ющихся тканях, например в эпителии кишечника, но в этом случае активность теломеразы, как правило, ниже, чем в опухолевых клетках (рис. 2). Теломеразная активность более характерна для злокачественных опухолей, в доброкачественных опухолях ее активность и частота обнаружения заметно ниже [10]. Определение теломеразной активности используется как для диагностики опухолей, так и для поиска потенциальных противоопухолевых средств – ингибиторов теломеразы. Кроме того, теломераза участвует в регенерации тканей после частичного удаления печени и инфаркта миокар-

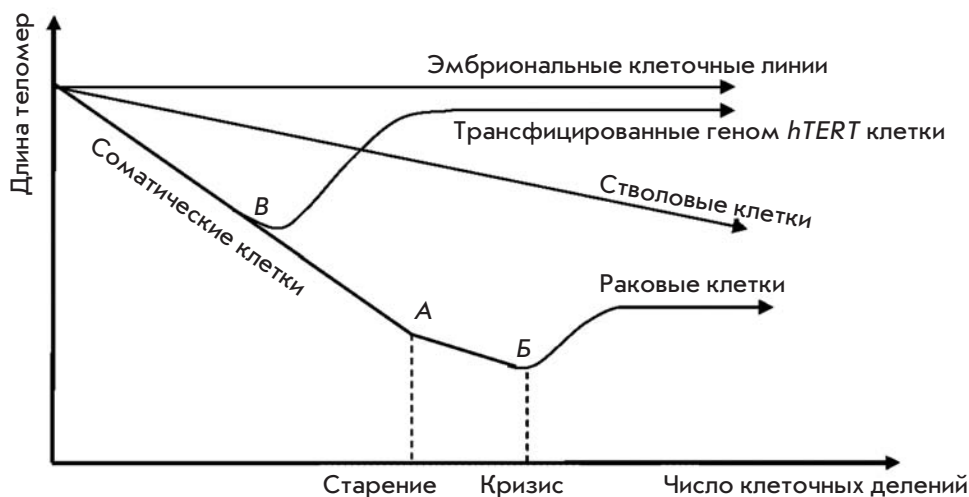


Рис. 2. Зависимость длины теломер от числа делений в различных типах клеток: эмбриональных клеточных линиях, соматических клетках и трансфицированных hTERT клетках. А – достижение клетками предела Хейфлика; В – кризис, сопровождающийся гибелью клеток и перерождением уцелевших в опухолевые; В – трансфекция клеток геном hTERT.

Таблица 1. Некоторые олигонуклеотиды, используемые в различных модификациях TRAP

Олигонуклеотид	Нуклеотидная последовательность
TS	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'
CX	5'-(CCCTTA) ₃ CCCTAA-3'
ACX	5'-GCGCGG(CTTACC) ₃ СТААСС-3'
RP	5'-TAGAGCACAGCCTGTCCGTG-3'
RPC3	5'-TAGAGCACAGCCTGTCCGTG(СТААСС) ₃ -3'
TSG4	5'-GGGATTGGGATTGGGATTGGGTT-3'

да. Роль теломеразы в старении в связи с работой теломер как «клеточных часов» также привлекает внимание.

МЕТОДЫ С АМПЛИФИКАЦИЕЙ СИНТЕЗИРОВАННОЙ ТЕЛОМЕРАЗЫ ДНК (TRAP)

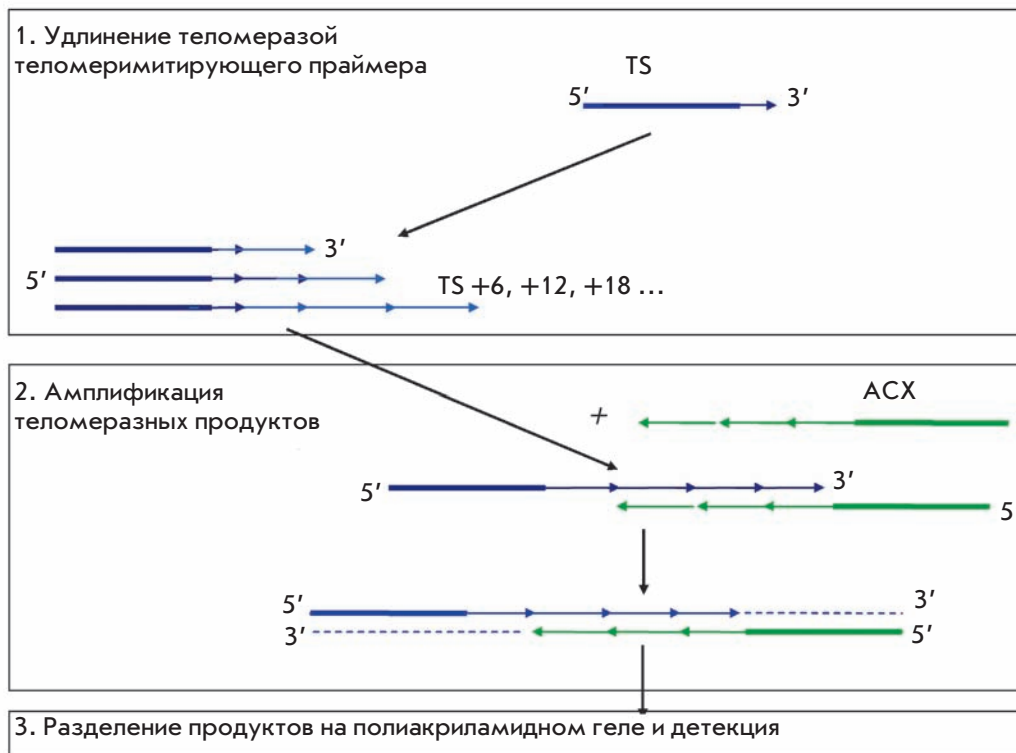
Среди методов определения активности теломеразы наиболее распространен TRAP (протокол амплификации теломерных повторов) [11], позволяющий, благодаря некоторым модификациям, проводить полуколичественный и количественный анализ. Существуют модификации, при которых повышается скорость анализа, радиоактивная метка заменяется немечеными соединениями, снижается количество побочных продуктов и т.д., например, методы сцин-

тилляционного анализа сближения, гибридизационной защиты, транскрипционной амплификации, экстракции магнитными шариками [12]. Некоторые модификации дают возможность определять активность теломеразы даже в одной клетке [13].

Протокол амплификации теломерных повторов можно разбить на три основных этапа: удлинение праймера, амплификация синтезированной теломеразой ДНК и детекция. На стадии удлинения теломерные повторы добавляются теломеразой, присутствующей в клеточном экстракте, к теломеримитирующему олигонуклеотиду (TS, см. табл. 1). После этого проводят ПЦР-амплификацию синтезированной теломеразой ДНК с использованием специфических праймеров (теломеримитирующего и обратного). На этом этапе в синтезированную теломеразой ДНК могут включаться различные метки: радиоактивная, флуоресцентная, аффинная. Затем следует детекция (в оригинальном методе с электрофоретическим разделением продуктов ПЦР и фотографиями) (рис. 3).

Исходный метод TRAP не свободен от ряда недостатков. При амплификации продуктов ПЦР первоначально применяли олигонуклеотид CX, имевший комплементарное перекрытие в несколько олигонуклеотидов с TS. Это приводило к образованию димеров праймеров и продуктов, возникающих из-за взаимодействия между праймерами. Даже при использовании оптимального праймера ACX

Рис. 3. Схема протокола амплификации теломерных повторов (TRAP).



с некоплементарным TS-концом при анализе концентрированных экстрактов опухолевых тканей может появляться фоновый сигнал [14]. Другая проблема состоит в том, что если использовать обратные праймеры, полностью соответствующие теломерным повторам, то праймеры отжигаются в ходе ПЦР не по краям матрицы (в силу периодичности теломер) и появляются ложные сигналы. Эту проблему решают, добавляя на края праймера дополнительные некоплементарные теломерам участки (табл. 1) с 5'-концевым нетеломерным «довеском» из 6 нуклеотидов. Может использоваться комбинация нескольких праймеров, используемых в качестве обратных, для уменьшения неспецифических сигналов (подробнее о двухпраймерной системе далее, праймеры RP и RPC3 приведены в табл. 1). В смесь TRAP для оценки влияния стабилизирующих квадруплексы ингибиторов может добавляться олигонуклеотид TSG4 (табл. 1), который не требует синтеза теломеразой нескольких повторов до начала действия ингибитора [15]. Более подробно преимущества и недостатки различных олигонуклеотидов, используемых в TRAP, рассмотрены в работе [12]. Кроме того, если использовать ПЦР для амплификации сигнала, то на результат определения теломеразной активности могут влиять ингибиторы ПЦР, содержащиеся в образце.

Первоначально в методе TRAP продукты ПЦР выявляли в полиакриламидном геле (ПААГ) по радиоактивной метке, которую вводили с помощью радиоактивно меченного праймера или встраивали в ДНК в ходе реакции. Метод позволяет качественно оценивать активность и процессивность теломеразы в экстрактах клеток и тканей, но, как уже сказано, нуждается в радиоактивных препаратах.

ПЦР второй стадии TRAP позволяет получить достаточно ДНК для окрашивания в геле, например бромидом этидия [16] (достаточно сильный мутаген, чувствительность невысокая), нитритом серебра [17] (чувствительность, как при использовании радиоактивной метки, но метод более трудоемкий и сравнительно дорогой), Sybr Green [18] и его аналогами (чувствительность, как при использовании радиоактивной метки [19], а мутагенность гораздо ниже, чем у бромида этидия, хотя он также является интеркалирующим красителем). Возможно также и флуоресцентное мечение олигонуклеотидов, используемых в TRAP [20].

Очистка синтезированной теломеразой ДНК и эффективность TRAP

Получить экстракты опухолевых клеток или клеточных линий и определить в них теломеразную активность достаточно просто, тогда как ткани состоят из нескольких типов клеток и могут содержать ве-

щества, влияющие на количественную и даже качественную оценку теломеразной активности. Поэтому возможны ложноположительные или ложноотрицательные результаты, которые могут повлиять на правильность диагноза и прогноз заболевания. Определение теломеразной активности могут затруднять и особенности биопсийных образцов: большие объемы жидкости (кровь и т.д.) или присутствие многочисленных нормальных клеток. В этих случаях возможна экстракция синтезированной теломеразой ДНК при помощи модифицированных магнитных шариков. При этой процедуре ингибиторы ПЦР удаляются или сильно разбавляются. Метод TRAP с такой экстракцией состоит из трех основных этапов: удлинение субстратимитирующего олигонуклеотида теломеразой, выделение синтезированной теломеразой ДНК с помощью модифицированных магнитных шариков, амплификация. На этапе экстракции синтезированную теломеразой ДНК гибридизуют с С-богатым биотинилированным праймером (СССТАА)₂ и выделяют ее из реакционной смеси с помощью покрытых стрептавидином магнитных шариков. Затем синтезированную теломеразой ДНК высвобождают из комплекса с помощью нагревания и проводят ПЦР. Эта модификация имеет на порядок меньшую чувствительность к ингибиторам ПЦР по сравнению со стандартным TRAP и несколько большую эффективность при анализе тканевых и других комплексных образцов [21]. Вместо биотинилированного праймера и магнитных шариков можно использовать экстракцию фенолом и хлороформом [16], хотя при этом хуже удаляются примеси, хорошо растворимые в воде, а не в органических растворителях.

Внутренние стандарты TRAP

Учесть возможное присутствие в образцах ингибиторов Taq-полимеразы (например, гемсодержащих соединений) и осуществить общий контроль ПЦР позволяют внутренние стандарты (амплифицируемые с теми же праймерами, что и синтезированная теломеразой ДНК), которые также могут служить для нормирования количества синтезированной теломеразой ДНК. Наиболее распространены два стандарта – длиной 36 и 150 п.н. Стандарт 36 п.н. избыточно амплифицируется, если образцы имеют низкую теломеразную активность, конкурируя с синтезированной теломеразой ДНК и давая ложноотрицательный сигнал [18]. Стандарт 150 п.н. более чувствителен к присутствию ингибиторов Taq-полимеразы в реакционной смеси. Стандарты можно использовать в TRAP с ПЦР в реальном времени с праймерами, флуоресцентная метка которых отличается от метки в праймерах для амплификации синтезированной теломеразой ДНК [22].



Рис. 4. Схема «двухпраймерного» TRAP [23, 24].

TRAP с дополнительным специфичным обратным праймером («двухпраймерный»)

«Двухпраймерный» TRAP – это модификация стандартного TRAP, предназначенная для уменьшения ложных сигналов (рис. 4).

В этом варианте TRAP отсутствует электрофоретический анализ продуктов ПЦР. В нем оценивается суммарная радиоактивность как критерий теломеразной активности. Синтезированная теломеразой ДНК амплифицируется с использованием двух обратных праймеров, длиной 20 (RP) и 38 нуклеотидов (RPC3) (табл. 1), в присутствии [³H]TTP или [α-³²P]dCTP, при этом длинного праймера добавляют в 50 раз меньше, чем короткого. После ПЦР двухцепочечную ДНК отделяют осаждением и фильтрацией. Преимущество этого метода состоит в том, что благодаря низкой концентрации праймера RPC3 уменьшается количество продуктов взаимодействия между праймерами, а присутствие стандартных количеств праймера RP обеспечивает значительную степень амплификации синтезированной теломеразой ДНК [23, 24]. Метод позволяет качественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

TRAP с праймерами с резонансным переносом энергии (FRET)

Один из вариантов окрашивания ДНК в методе TRAP – использование праймеров с энергопереносом (амплифлуоров). Амплифлуоры имеют уникальную шпильчатую структуру, содержащую донор (флуоресцеин) и акцептор (4'-диметиламинофенилазобензойная кислота). Флуоресценция появляется только в случае встраивания праймера в продукты ПЦР, т.е. отпадает необходимость в применении радиоизотопов и резко сокращается объем проводимого после ПЦР-анализа. Замена амплифлуорами субстрата теломеразы и обратного праймера позволяет добиться достаточно высокой интенсивности флуоресцентного сигнала. Праймеры, используемые для амплификации внутренних стандартов, должны иметь донорно-акцепторную пару с иной длиной волны флуоресценции, чем праймеры, используемые для амплификации синтезированной теломеразой ДНК [22].

Метод с использованием резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением (HTRF) сочетает стандартную технику FRET и флуорофоры с длительным временем затухания флуорес-

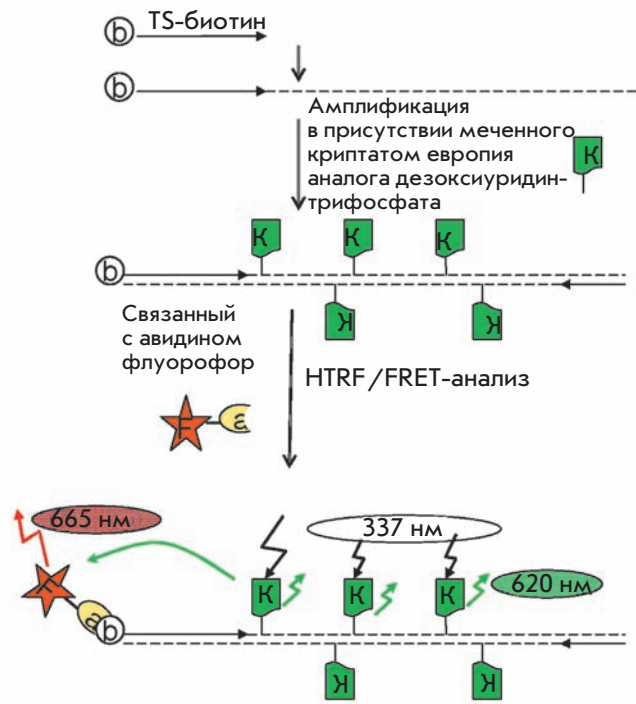


Рис. 5. Схема метода TRAP с использованием резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением [26]. F – флуорофор, а – авидин, b – биотин, К – меченный криптамом европия аналог дезоксиуридинтрифосфата.

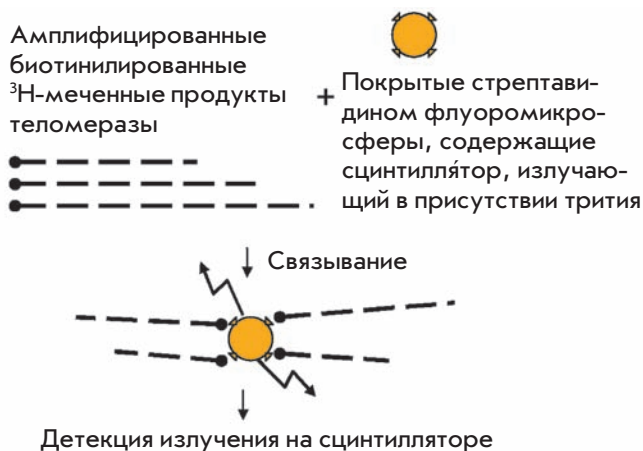


Рис. 6. Схема детекции в TRAP с помощью сцинтилляционного анализа сближения.

ценции. Метод основан на использовании криптаных комплексов европия или тербия. Данные лантаноиды обладают длительным периодом затухания флуоресценции, а комплексообразование с макроциклическими соединениями с образованием криптаных комплексов дополнительно увеличивает их стабильность [25]. Меченный криптаном европия аналог дезоксиуридинтрифосфата использовали для оценки количества ДНК в TRAP с биотинилированным олигонуклеотидом TS. После добавления конъюгата аллофикоцианин-стрептавидин ДНК в TRAP дает сигнал FRET [26] (рис. 5). Метод позволяет полуколичественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

TRAP с детекцией с помощью сцинтилляционного анализа сближения

Еще один вариант детекции амплифицированной в TRAP ДНК без ПААГ – сцинтилляционный анализ сближения. Используемый вместе с традиционным TRAP, он позволяет увеличить скорость анализа теломеразной активности. Субстратом в этом методе служат 5'-биотинилированные олигонуклеотиды, а амплификация происходит в присутствии [³H]ТТР. Биотинилированная ³H-меченная ДНК связывается с покрытыми стрептавидином флуоромикросферами, содержащими сцинтиллятор, излучающий в присутствии трития (рис. 6). Таким образом, вместо разделения ДНК в геле с последующей фотодетекцией выход продуктов ПЦР оценивают на сцинтилляционном счетчике, что позволяет сократить время анализа после ПЦР до 1 ч и полуколичественно определить

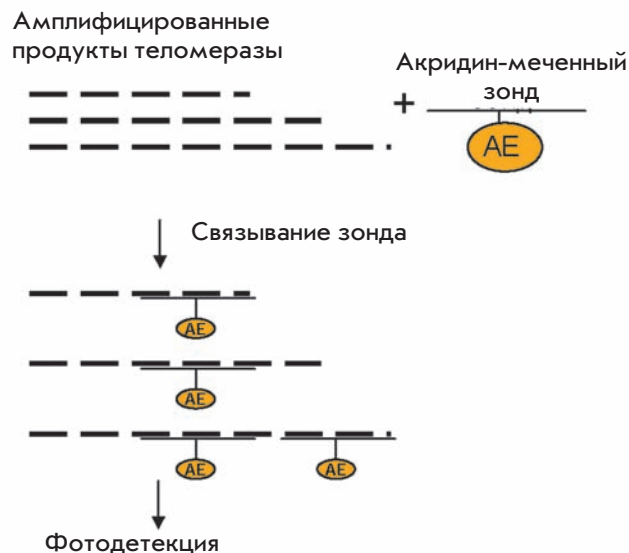


Рис. 7. Схема детекции в TRAP с детекцией методом «защиты гибридизацией».

активность теломеразы в больших сериях экстрактов тканей и клеточных линий. Чувствительность данного метода ограничена примерно 10 клетками. Основной недостаток метода – использование трития, кроме того, как и большинство методов детекции продуктов TRAP без ПААГ, он чувствителен к артефактам ПЦР [27].

TRAP с детекцией методом «защиты гибридизацией»

Более безопасной является модификация TRAP, в которой используется метод «защиты гибридизацией» (Hybridization protection assay-TRAP). В этом методе для детекции ДНК после амплификации применяют зонды, меченные ковалентно связанным акридином [28] (рис. 7). Эта же схема детекции используется в транскрипционной схеме амплификации теломеразных повторов. Метод позволяет полуколичественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

TRAP в сочетании с иммуноферментным анализом (ИФА)

В методе TRAP-ИФА ДНК после амплификации определяют колориметрически, что позволяет качественно и полуколичественно оценивать теломеразную активность. Биотинилирование TS-праймаера дает возможность связывать амплифицированную ДНК с покрытыми стрептавидином микропланшета-



Рис. 8. Схема иммуноферментного определения продуктов ПЦР при TRAP-анализе (или продуктов теломеразной реакции при прямом ИФА).

ми (рис. 8). Амплифицированная ДНК денатурирует, гибридизуется с мечеными дигоксигенином (DIG) зондами, специфичными к теломерным повторам, и связывается с микропланшетами за счет взаимодействия стрептавидин–биотин. Этот комплекс выявляется с помощью поликлональных антител овцы к DIG, конъюгированных с пероксидазой хрена, активность которой определяют колориметрически [29, 30]. От гибридизационного варианта TRAP этот метод отличается появлением второго шага усиления сигнала за счет ферментативной реакции.

К недостаткам TRAP-ИФА можно отнести сложности с разделением теломераза-положительных и теломераза-отрицательных контролей, которые могут возникнуть из-за отсутствия внутренних контролей и двух шагов усиления сигнала. Тем не менее метод TRAP-ИФА более быстрый по сравнению с TRAP, основанным на разделении амплифицированной ДНК в геле, что позволяет использовать его в скрининговых исследованиях. Метод пригоден для полуколичественного определения активности теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

TRAP с электрохимической детекцией

После ПЦР в TRAP можно отделить непрореагировавшие нуклеотидтрифосфаты, а затем обработать оставшиеся продукты 3 М HCl. В рассматриваемом методе электрохимически определяют dGMP, один из продуктов полного гидролиза амплифицированной ДНК [31]. Метод позволяет полуколичественно опре-

делять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии. Метод не имеет особых преимуществ перед другими методами, в которых не используют гель-электрофорез и радиоактивное мечение, но при этом достаточно трудоемок.

TRAP с ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени используют для одновременной амплификации ДНК и измерения количества продуктов, получаемых после каждого цикла амплификации. Стандартный TRAP в комбинации с ПЦР в реальном времени позволяет получать количественные результаты [32, 33]. Этот метод применим для изучения ингибиторов теломеразы и анализа больших серий образцов [12]. Сравнение с традиционным TRAP показывает, что без оценки количества продуктов ПЦР в реальном времени возможно завышение теломеразной активности и сглаживание небольших различий в активности из-за насыщения ПЦР-реакции на последних циклах. Кроме того, дополнительную проблему представляет возможность образования димеров праймеров и появление вследствие этого ложноположительного сигнала. Остроту этой проблемы можно снизить, если использовать обратный праймер с «якорем», мешающим образованию димеров, уменьшить количество праймеров и число циклов, в результате чего праймер-димеры образуются преимущественно на поздних циклах программы (35–39 циклов), в то время как в стандартном TRAP таких циклов 28. Эта проблема уменьшается и при измерении флуоресценции в ранней экспоненциальной фазе ПЦР [32]. Метод позволяет количественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10–50 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

Как и стандартный TRAP с гель-электрофорезом, TRAP с ПЦР в реальном времени имеет несколько вариантов детекции. Например, использование зондов, специфичных к амплифицированной в ПЦР синтезированной теломеразой ДНК, флуоресцирующих лишь в составе дуплекса, в противном случае эти зонды образуют нефлуоресцирующую шпильчатую структуру [34].

TRAP на микрочипах

Метод TRAP на микрочипах представляет собой сочетание двухпраймерного TRAP и связывания продуктов ПЦР на чипах с последующей гибридизацией зондов и детекцией. Для определения синтезированной теломеразой ДНК и внутреннего стандарта используют разные флуоресцентные метки: Су3

для амплифицируемой синтезированной теломеразой ДНК и Су5 – для стандарта. К достоинствам этого метода можно отнести высокую скорость детекции синтезированной теломеразой ДНК при поточном анализе и повышенную специфичность за счет использования соответствующих зондов [35]. Метод позволяет полуколичественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

TRAP *in situ*

Теломеразную активность анализируют, как правило, в клеточном экстракте. Если клеточные линии однородные, то результат отражает активность теломеразы в клетках. Если же изучают экстракты образцов опухолевых тканей, то иногда имеет смысл рассматривать лишь сам факт наличия или отсутствия теломеразной активности, поскольку содержание опухолевых клеток в таких образцах варьирует от 3 до 90% и более. В этом случае результаты ничего не говорят об уровне теломеразной активности в клетках разного типа, составляющих ткань, а также о различиях между опухолевыми и нормальными клетками одной ткани (например, повышение активности теломеразы в крови связано с появлением активированных лейкоцитов или перерождением каких-то клеток крови). Чтобы преодолеть этот недостаток создан *in situ* TRAP, в котором используют FITC-меченные прямой и обратный праймеры [36]. В этом методе образцы в виде взвеси клеток иммобилизуют на покрытые силаном стекла и сушат холодным воздухом. Затем на каждый образец наносят реакционную смесь для TRAP, инкубируют, теломеразу инактивируют нагреванием, добавляют обратный праймер с полимеразой и проводят ПЦР *in situ*. По окончании реакции стекла анализируют на флуоресцентном микроскопе, типы клеток определяют с помощью окрашивания. По интенсивности флуоресценции и ее локализации (ядро/цитоплазма) определяют активность теломеразы в отдельных типах клеток в смеси. В уро- и бронхиальных смывах высокая теломеразная активность проявляется яркой флуоресценцией ядер злокачественных, но не доброкачественных клеток [37, 38]. Сравнение со стандартно окрашенными препаратами указывает на связь флуоресценции в ядре со злокачественными клетками, в то время как сигнал от цитоплазмы обнаруживается в гранулоцитах и макрофагах [39]. Сходная корреляция найдена при анализе плеврального выпота [40]. Более того, *in situ* TRAP успешно применяли не только к образцам клеточных суспензий, но и на срезах тканей, в частности для диагностики рака печени [41]. Метод позволяет полуколичественно

определять активность теломеразы и ее локализацию в отдельных клетках тканей и клеточных суспензий.

Транскрипционная амплификация синтезированной теломеразой ДНК

Для увеличения количества синтезированной теломеразой ДНК вместо ПЦР используют транскрипционную амплификацию. В комбинации с «защитой гибридизацией» этот метод позволяет измерять активность теломеразы всего за 4 ч. Праймер, служащий субстратом для теломеразы, содержит не только теломеримитирующую последовательность, но и сайт посадки Т7-РНК-полимеразы. Синтезированная теломеразой ДНК служит субстратом для гибридизации обратного праймера, содержащего дополнительную последовательность, не комплементарную теломерным повторам, за счет которой обратный праймер присоединяется к концу синтезированной теломеразой ДНК, и на следующем этапе происходит достройка двухцепочечной ДНК. Используя эту ДНК как матрицу, Т7-РНК-полимераза синтезирует РНК, по которой обратная транскриптаза синтезирует новую цепь ДНК. После этого РНК удаляется РНКазой, а по одноцепочечной ДНК с помощью прямого праймера достраивается вторая цепь ДНК (рис. 9).

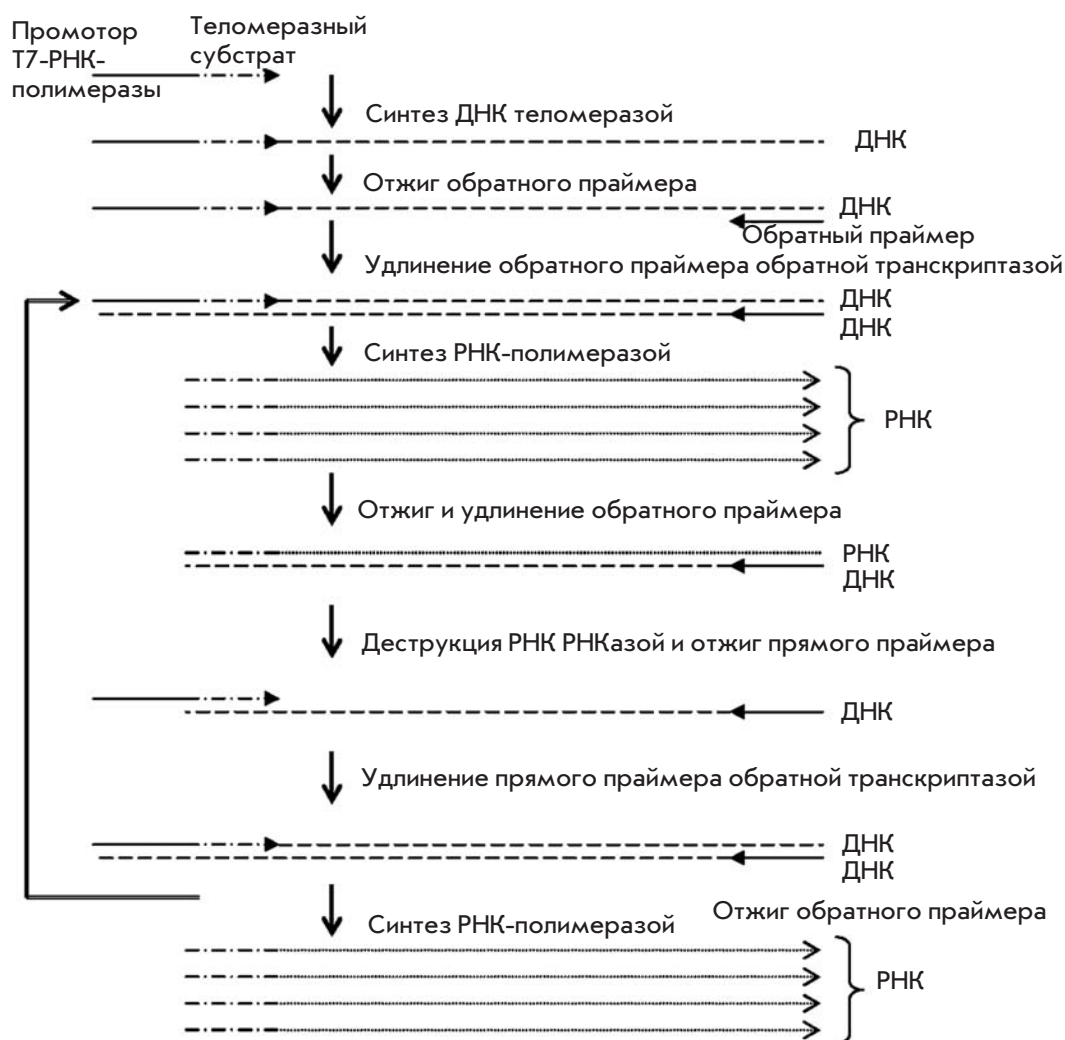
С помощью этой схемы можно за 75 мин при 40 °С амплифицировать синтезированную теломеразой ДНК в количествах, сопоставимых с ПЦР. Последующие реакции могут проводиться в той же пробирке, что и амплификация. Чувствительность метода позволяет выявлять теломеразную активность в образцах из 1–1000 клеток. Метод чувствителен к присутствию РНКаз [12, 42]. Основное преимущество метода перед TRAP с ПЦР-амплификацией – отсутствие прогревания образца при амплификации и игнорирование специфических ингибиторов Taq-полимеразы. Метод позволяет полуколичественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

ПРЯМАЯ ДЕТЕКЦИЯ СИНТЕЗИРОВАННОЙ ТЕЛОМЕРАЗЫ ДНК

Детекция теломеразной активности с помощью прямого включения радиоактивно меченного субстрата

Метод основан на способности теломеразы удлинять олигонуклеотиды в присутствии dNTP. Если олигонуклеотид или один из dNTP (как правило dGTP, так как синтезируемые теломеразой теломеры обогащены остатками гуанина) содержит радиоактивную метку, то по ее включению в ДНК можно элек-

Рис. 9. Схема детекции теломеразной активности с заменой ПЦР-амплификации теломеразных продуктов на транскрипционную амплификацию [12, 42].



трофоретически оценивать активность теломеразы [43]. Основные недостатки метода – использование больших количеств радиоактивных изотопов и недостаточная во многих случаях чувствительность, обусловленная низким содержанием теломеразы в клетках и тканях.

Метод с использованием радиоактивного мечения без дополнительного усиления сигнала был первым методом определения теломеразной активности. До сих пор он остается основным при изучении теломеразы организмов со слаборегулярными теломерами (например, *Saccharomyces cerevisiae*). Этот метод применяется и сейчас для детального исследования синтезированной теломеразой ДНК и количественных измерений. Метод позволяет количественно определять активность и процессивность теломеразы в экстрактах клеточных линий, но обладает низкой чувствительностью (10000 клеток теломеразоположительной клеточной линии).

Определение синтезированной теломеразой ДНК по изменению поверхностного плазмонного резонанса

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) возникает на поверхности металла при условии полного внутреннего отражения и характеризуется специфическим углом отражения, а следовательно, показателем преломления. Этот эффект, возникая на поверхности металлической пленки, распространяется в глубь раствора, затухая экспоненциально как функция расстояния. Взаимодействия между молекулами изменяют затухающую волну, что влияет на характеристики поверхностного плазмона и что выражается в изменении резонансного угла и показателя преломления в поверхностном слое. По изменению показателя преломления судят о взаимодействии биомолекул (рис. 10А).

С помощью биосенсора методом ППР можно прямо измерять теломеразную активность как соответ-

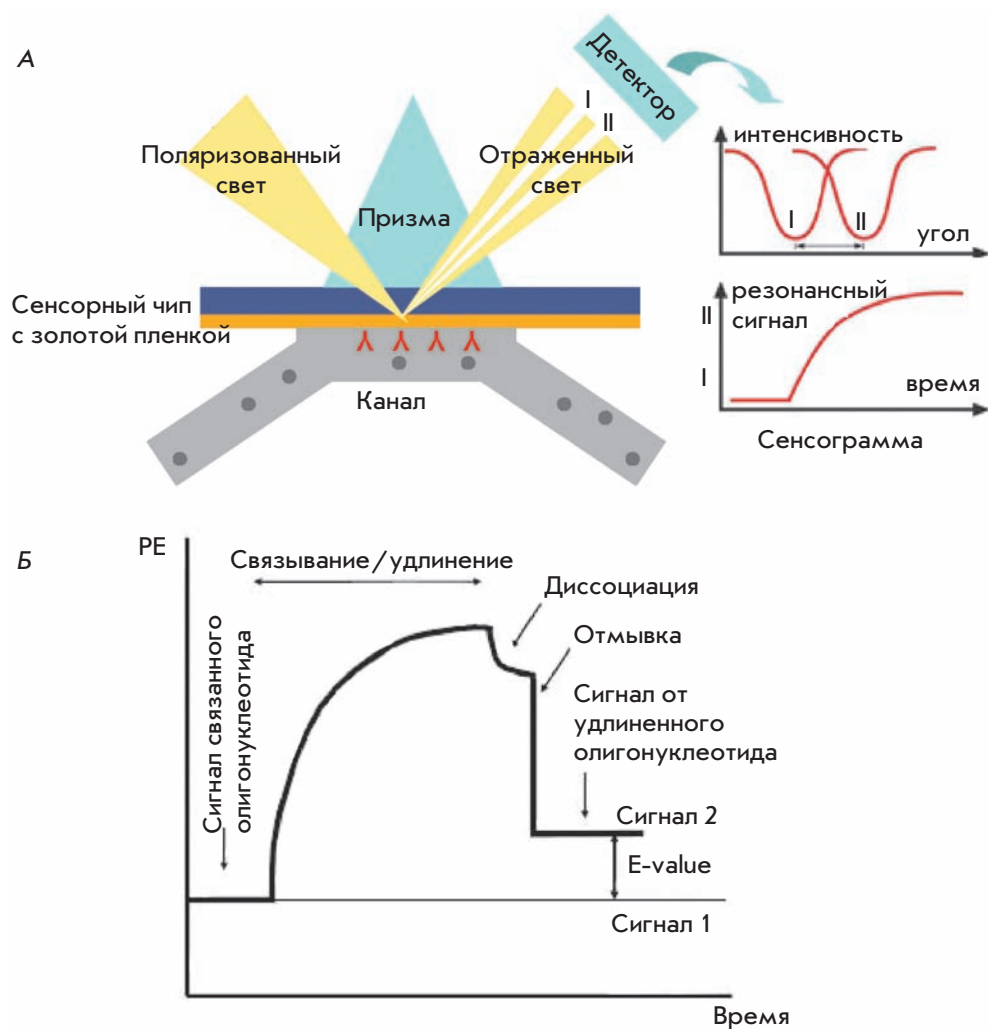


Рис. 10. Схема применения поверхностного плазмонного резонанса для детекции макромолекул и соответствующая общей схеме сенсограмма (А) и сенсограмма ППР-метода определения теломеразной активности (Б). РЕ – резонансные единицы. Разница между сигналами 1 и 2 отражает синтез ДНК теломеразой [44].

ствующее удлинение теломеримитирующего олигонуклеотида.

5'-Биотинилированные олигонуклеотиды, содержащие теломерные повторы, иммобилизуют на предобработанной стрептавидином поверхности декстранового сенсора *in situ* на аппарате BIACORE. После этого их обрабатывают клеточным экстрактом. Если экстракт содержит теломеразу, то происходит связывание теломеразы и удлинение олигонуклеотида, определяемое по ППР после отмывки от белков раствором додецилсульфата натрия (рис. 10Б). Степень удлинения олигонуклеотида зависит от концентрации препарата и времени реакции. Результаты анализа экстрактов опухолей и клеточных линий этим методом, а также тестирования ингибиторов теломеразы коррелируют с данными, полученными методом TRAP [44]. Интенсивность сигнала можно увеличить, обрабатывая сенсор с синтезированной теломеразой ДНК антисмысло-

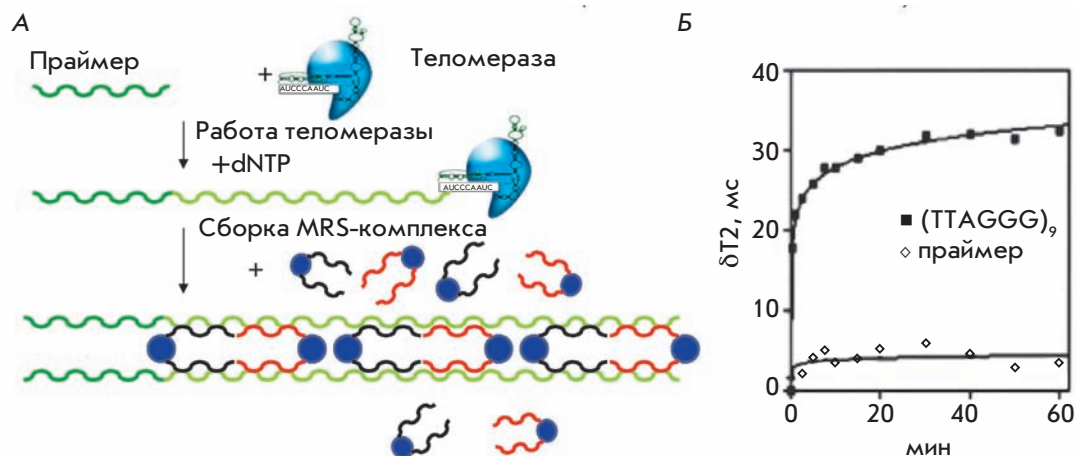
выми олигонуклеотидами к теломерам, ковалентно связанными со стрептавидином и наночастицами золота [45].

Метод позволяет количественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий, а также получать информацию о кинетике реакции, показывая связывание и диссоциацию теломеразы от субстрата. Предел чувствительности метода – экстракт 50 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

Определение теломеразной активности с помощью модифицированных олигонуклеотидами магнитных частиц и ЯМР

Метод основан на использовании магнитных частиц оксида железа, модифицированных олигонуклеотидами, комплементарными теломерным повторам. Эти частицы, связываясь за счет комплементарных взаимодействий с синтезированной теломеразой

Рис. 11. Магнитный наносенсор теломеразы. А – Схема образования MRS-комплекса. Б – Сравнение изменений T2 в присутствии праймера и теломерподобного 54-нуклеотидного олигонуклеотида [46].



повторами, образуют протяженные линейные структуры (MRS-комплексы) (рис. 11А). Эффект от этой гибридизации определяют по спин-спиновому времени релаксации. При образовании организованного ансамбля наночастиц время магнитной релаксации окружающих молекул воды заметно изменяется, что можно измерять в релаксометре (релаксометр измеряет времена спин-спиновой релаксации ядерной намагниченности протонсодержащих жидкостей в многокомпонентных системах и содержание компонентов с различными временами релаксации). Магнитное переключение происходит быстро, достигая половины максимального изменения через 30 с и выходя на плато через 40–60 мин (рис. 11Б). Магнитное переключение подтверждено методом магнитно-силовой микроскопии, а также корреляцией магнитного переключения и размера формируемых наночастиц. Локальное искажение магнитного поля возрастает на наночастицах в упорядоченных ансамблях, а неорганизованные наночастицы дают гораздо меньший магнитный эффект [46].

Время релаксации измеряли в объеме 200–500 мкл при магнитной индукции 0.47 Тл в ЯМР-спектрометре. Для магнитно-резонансного сканирования 384-лучных плашек с 50 мкл смеси при 1.5 Тл оценивали время не только спин-спиновой (T2), но и спин-решеточной релаксации (T1). Адаптация к поточной обработке с использованием магнитно-резонансного сканирования позволила с высокой чувствительностью анализировать сотни образцов за десятки минут [46]. Метод позволяет количественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий с использованием высокопроизводительного микропланшетного формата. Для таких анализов помимо распространенного оборудования и реактивов нужны планшетный ЯМР-спектрометр и проба из наночастиц, модифицированных олигонуклеотидами.

Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

Определение активности теломеразы с помощью метода микробаланса кварцевого кристалла

Для микрогравиметрического анализа теломеразной активности методом микробаланса кварцевого кристалла может использоваться Au-кварцевый резонатор. Кристаллы кварца обладают пьезоэлектрическим эффектом. Приложение переменного тока приводит к возникновению в кристалле кварца колебаний, причем в специально вырезанных кристаллах ток определенной частоты может приводить к образованию стоячей волны, резонансную частоту которой можно определить весьма точно и которая изменяется при связывании лигандов на поверхности кристалла. Метод микробаланса кварцевого кристалла в жидкостях используется при определении аффинного связывания молекул (в частности, белков) на поверхностях, содержащих соответствующие участки узнавания.

В этом методе теломеримитирующий олигонуклеотид связывают с поверхностью сенсора, удлиняют его теломеразой и проводят гибридизацию синтезированной цепи ДНК с биотинилированным олигонуклеотидом (рис. 12А). Альтернативный вариант – удлинение связанного с сенсором теломеримитирующего олигонуклеотида в присутствии биотин-меченного НТР (рис. 12Б). Затем поверхность сенсора обрабатывают конъюгатом авидина с щелочной фосфатазой и раствором субстрата щелочной фосфатазы – 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата, который гидролизует с образованием нерастворимого продукта на поверхности сенсора. При определении теломеразной активности по уменьшению частоты резонанса кристалла видны шаги удлинения олигонуклеотида, связывания с синтезированной теломеразой ДНК конъюгата ави-

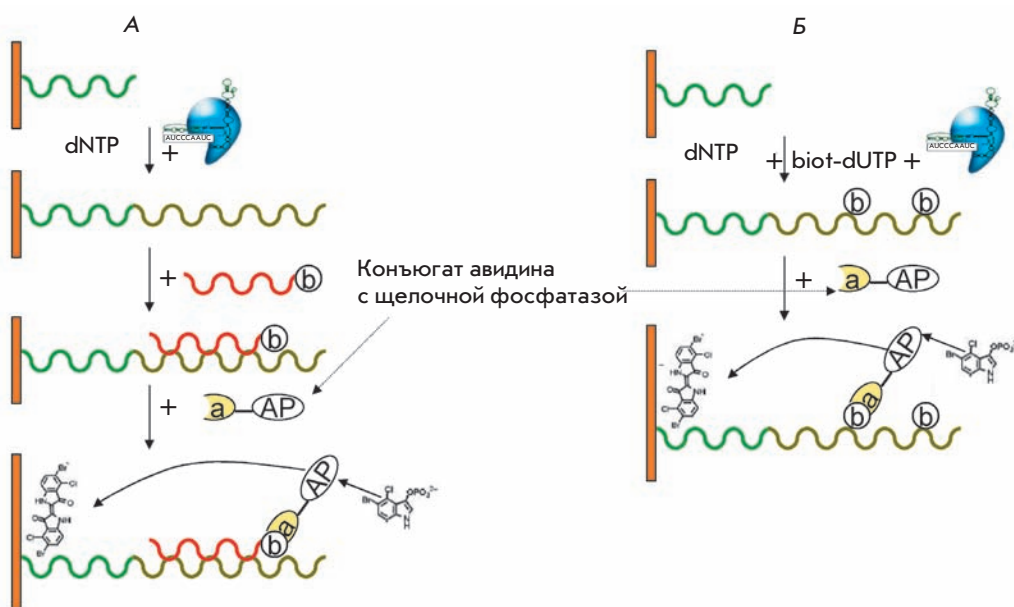


Рис. 12. Схема процессов на сенсоре в методах микробаланса кварцевого кристалла и электрохимического определения. b – биотин в составе олигонуклеотида, a-AP – конъюгат авидина с щелочной фосфатазой, dNTP – смесь нуклеозидтрифосфатов, biot-dUTP – меченный биотином dUTP. А – Встраивание биотин-меченного нуклеотида в синтезированную теломеразой ДНК. Б – Гибридизация биотин-меченного олигонуклеотида с синтезированной теломеразой ДНК [47].

дина с щелочной фосфатазой и осаждение на поверхности кристалла продуктов реакции, катализируемой щелочной фосфатазой [47]. Метод позволяет с высокой скоростью количественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 3300 клеток теломераза-положительной клеточной линии. Для метода нужен частотный анализатор и Au-кварцевый кристалл. Кроме того, затруднена идентификация артефактных сигналов.

Электрохимическая детекция теломеразной активности с ферроценилнафталиндиимидом

Этот метод основан на способности теломерных повторов образовывать G-квадруплексы. Теломераза

удлиняет олигонуклеотид, закрепленный на электроде. Затем синтезированные теломерные повторы в присутствии высоких концентраций ионов калия образуют квадруплексы, а ферроценилнафталиндиимид в таких условиях может стехиометрически связываться с квадруплексами ДНК и стабилизировать их структуру (рис. 13). В свою очередь, связанный ферроценилнафталиндиимид можно определить электрохимическими методами. В этом методе оценивается число свернутых в квадруплекс фрагментов ДНК, которое зависит не только от общего числа повторов, но и непрогнозируемо от длины и расположения отдельных фрагментов ДНК, что можно считать недостатком. Чувствительность метода достаточна для определения синтезированной теломеразой ДНК

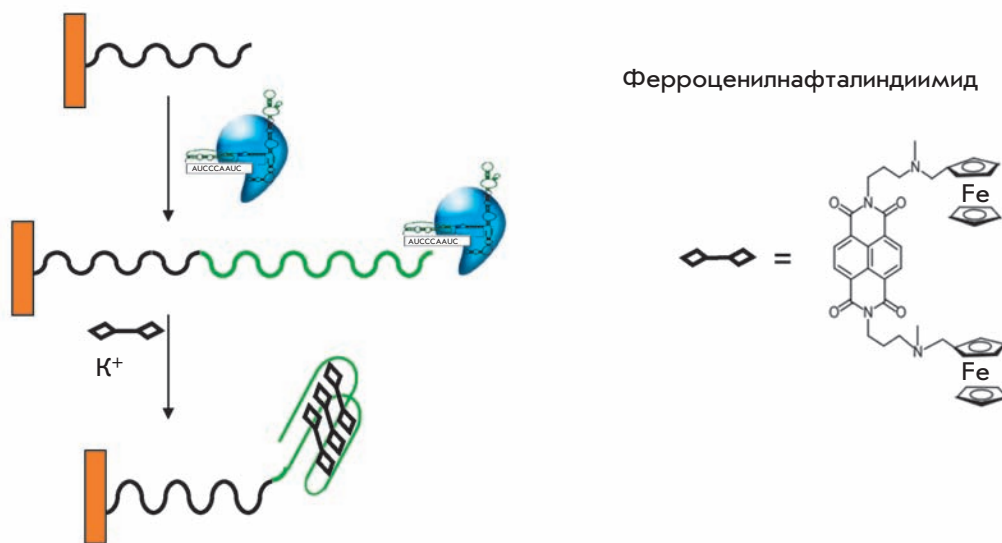
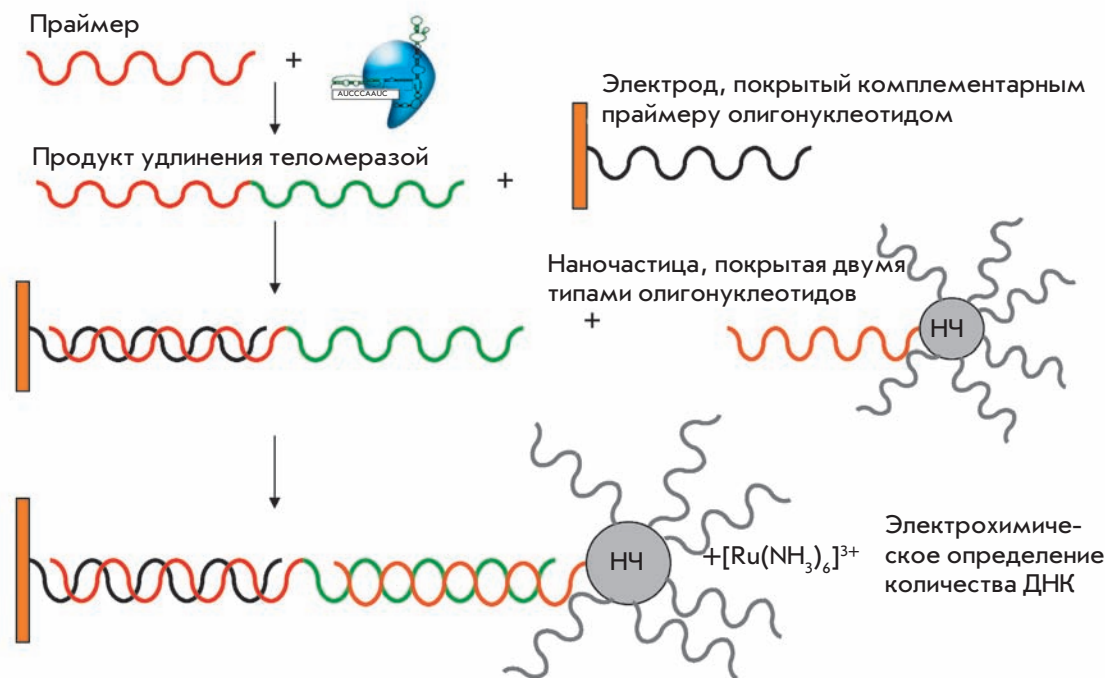


Рис. 13. Схема образования электрохимически определяемого комплекса при определении теломеразной активности с ферроценилнафталиндиимидом [48].

Рис. 14. Электрохимический метод для высокочувствительного определения теломеразной активности, основанный на усилении сигнала с помощью биобаркода [49]. НЧ – наночастицы.



без амплификации [48] (100–1000 клеток теломераза-положительной клеточной линии), но метод не апробирован на экстрактах опухолевых тканей.

Использование биобаркода для определения теломеразной активности

Наиболее чувствительный на сегодняшний день метод прямого измерения теломеразной активности без амплификации синтезированной теломеразой ДНК основан на системе биобаркода. В оригинальной системе биобаркода магнитные микрочастицы связываются с мишенью, которая затем за счет взаимодействий антиген-антитело связывается с наночастицами, ковалентно модифицированными олигонуклеотидом, играющим роль биологического баркода. Получившийся «бутерброд» отделяют от реакционной смеси в магнитном поле, денатурируют и по высвободившимся фрагментам ДНК определяют результат. В системе определения теломеразной активности синтезированную теломеразой ДНК узнают с использованием комплементарных фрагментов ДНК. ДНК-наночастицы состоят из наночастиц золота и олигонуклеотидов двух типов. Один образует дуплекс с синтезированной теломеразой ДНК, а второй – нет, что уменьшает вероятность связывания с одной и той же наночастицей второй ДНК-мишени (рис. 14). Для детекции используется электроактивный комплекс $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$, способный связываться с отрицательно заряженными цепями ДНК за счет электростатических взаимодействий

[49]. Метод позволяет количественно определять активность теломеразы в экстрактах клеточных линий, но не апробирован на экстрактах опухолевых тканей. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

Определение активности теломеразы с использованием оптических биосенсоров

Принцип этого метода имеет определенное сходство с ППР: он основан на том, что при связывании мишени коэффициент преломления на поверхности сенсора изменяется пропорционально количеству связавшейся мишени. Избежать стерических затруднений помогает кассета из трех олигонуклеотидов, которые связываются с поверхностью сенсора. Фосфатные группы ковалентно взаимодействуют с поверхностью через 5'-конец олигонуклеотида. Затем с иммобилизованной ДНК комплементарно связывается олигонуклеотид, содержащий на 3'-конец короткий некомплементарный участок. Выступающий 3'-конец ДНК модифицирован фосфотиоатом, что в 10 раз увеличивает аффинность связывания теломеразы с праймером [50]. После обработки экстрактом, содержащим теломеразу, в присутствии dNTP фермент удаляли с поверхности сенсора протеиназой K (рис. 15А).

Активность теломеразы оценивали по сенсограмме поверхностной загрузки (нг/мм², определяемой по изменению коэффициента преломления) (рис. 15Б). Метод позволяет количественно определять активность теломеразы в экстрактах клеточных линий,

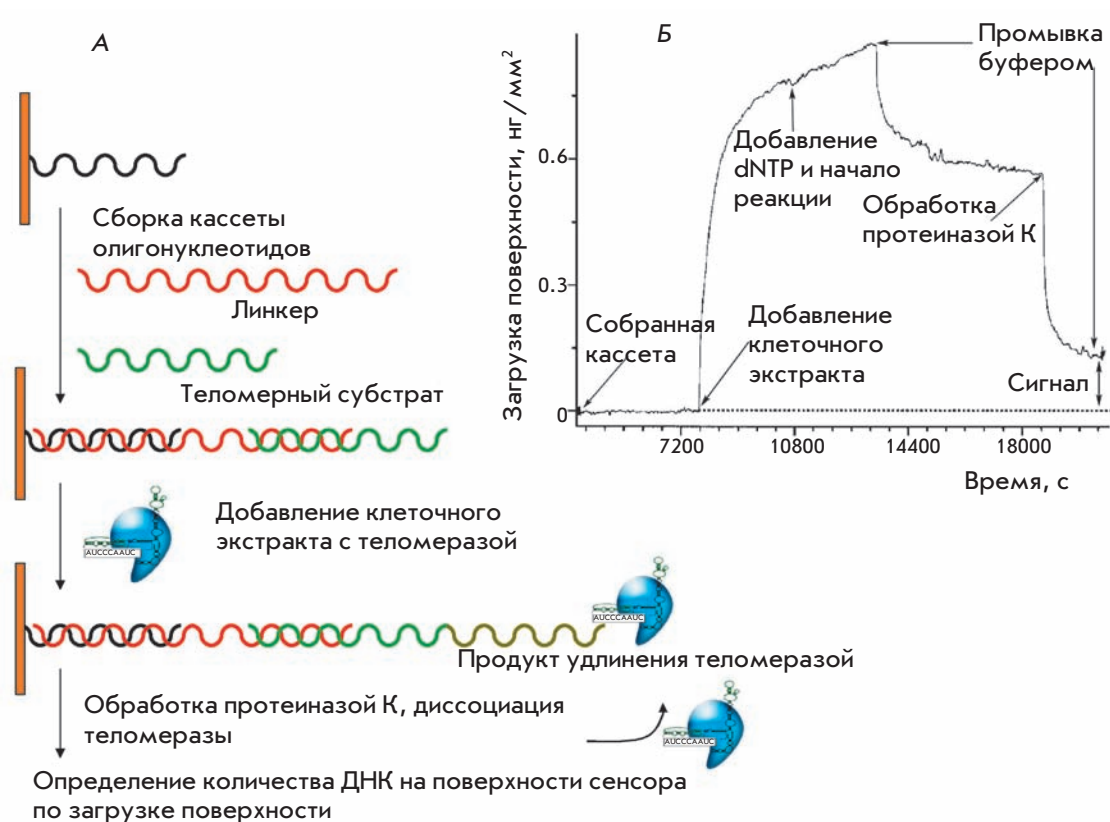


Рис. 15. А – Схема образования синтезированной теломеразой ДНК на поверхности сенсора. Б – Сенсограмма определения теломеразной активности на оптическом сенсоре [50].

но не пригоден для экстрактов опухолевых тканей, так как предел его чувствительности – экстракт 10^5 клеток теломераза-положительной клеточной линии. Кроме того, в этом методе используются фосфотиоатмодифицированные олигонуклеотиды и специальный оптосенсор.

Система определения активности теломеразы, основанная на квантовых точках

Квантовая точка – фрагмент проводника или полупроводника, ограниченный по всем трем пространственным измерениям и содержащий электроны проводимости. Точка должна быть настолько малой, чтобы квантовые эффекты были существенными. Это достигается, если кинетическая энергия электрона $E = \hbar^2/m_d$ (d – характерный размер точки, m – эффективная масса электрона на точке), обусловленная неопределенностью его импульса, будет заметно больше всех других энергетических масштабов, в первую очередь, больше температуры, выраженной в энергетических единицах. Квантовой точкой может служить любой достаточно маленький кусочек металла или полупроводника. Электрон в таком микрокристалле чувствует себя, как в трехмерной потенциальной яме, он имеет много стационарных уровней энергии с характерным расстоянием между

ними (точное выражение для уровней энергии зависит от формы точки). Как и при переходе между уровнями энергии атома, при переходе между энергетическими уровнями квантовой точки может излучаться фотон. При этом, в отличие от атомов, частотами переходов легко управлять, меняя размеры кристалла.

К наночастице (квантовой точке) присоединяют модифицированный на конце тио-группой теломеримитирующий олигонуклеотид. Такая квантовая точка способна флуоресцировать, поглощая квант с длиной волны λ_1 (400 нм) и излучая квант с длиной волны λ_1' (560 нм). Если при удлинении теломеразой присоединенного к квантовой точке олигонуклеотида в ДНК встраивается флуоресцирующий модифицированный нуклеотид TR-dUTP (dUTP, меченный текасским красным), то происходит перенос энергии флуоресценции (рис. 16А), что сопровождается уменьшением излучения с длиной волны λ_1' и появлением излучения с длиной волны λ_2 (610 нм) (рис. 16Б). Метод позволяет количественно оценивать активность теломеразы. Чувствительность метода равна примерно 10000 клеток линии Hela [51], что недостаточно для анализа клинических материалов.

Вместо включения TR-dUTP можно использовать способность теломерных повторов сворачиваться

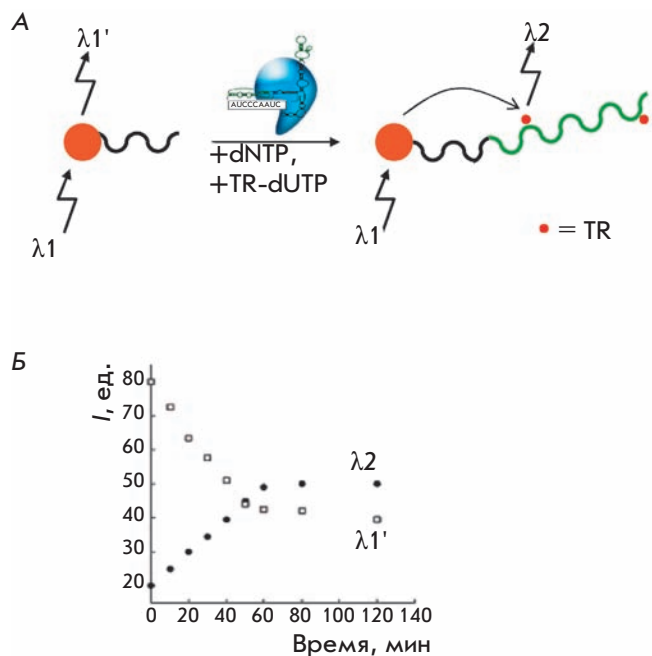


Рис. 16. Удлинение теломеразой олигонуклеотида, связанного с CdSe-ZnS квантовой точкой с включением TR-dUTP (А), и замена излучаемой длины волны квантовой точки (λ_1) на длину волны техасского красного (λ_2) при удлинении теломеразой олигонуклеотида, связанного с CdSe-ZnS квантовой точкой с включением TR-dUTP [51] (Б). TR – техасский красный.

в G-квадруплексы и связывать гемин. В этом случае перенос энергии происходит между квантовой точкой и комплексом G-квадруплекса с геминем с соответствующим тушением флуоресценции. Чувствительность метода – 270 клеток линии T293 [52].

Определение активности теломеразы с помощью сенсорного чипа на нанопроводе

Сенсорный чип представляет собой транзистор, включающий покрытые антителами кремниевые нанопровода, содержащие на поверхности альдегидные группы, к которым могут пришиваться моноклональные антитела. Проводимость покрытого антителами нанопровода изменяется при связывании антигенов, что и детектируется.

В случае сенсорного чипа для определения теломеразной активности нанопровод транзистора модифицируется не антителами, а теломеримитирующими олигонуклеотидами. При добавлении теломеразы и dNTP происходит удлинение связанных на поверхности олигонуклеотидов, что приводит к изменению проводимости транзистора, на котором связаны олигонуклеотиды [53]. Чувствительность метода – экстракт 100 клеток линии HeLa.

Сходный метод основан на использовании ион-селективного полевого транзистора. В присутствии определенных химических веществ на затворе таких транзисторов появляется потенциал, открывающий его канал проводимости, т.е. через него начинает течь ток, величина которого пропорциональна концентрации искомого компонента. Al_2O_3 -затвор транзистора модифицируется субстратом теломеразы. При удлинении праймера теломеразой меняется потенциал на затворе. Метод позволяет определять активность теломеразы в экстрактах клеточных линий (на клинических материалах метод не тестировался). Его чувствительность составляет 65 клеток линии T293 [54]. Основное преимущество метода – возможность проводить большое количество различных анализов одного образца на одном чипе, который может представлять собой набор сенсоров на разные маркеры. Кроме того, видны этапы связывания и диссоциации теломеразы.

Биоломинесцентный метод определения активности теломеразы

Определение теломеразной активности биоломинесцентным методом основано на том, что катализируемое теломеразой удлинение теломеримитирующего олигонуклеотида сопровождается отщеплением пирофосфата, количество которого определяют люцинометрическим методом. В присутствии аденозин-5'-фосфосульфата АТФ-сульфурилаза превращает пирофосфат в АТФ, содержание которого определяют люциферин-люциферазным методом. Чувствительность и специфичность метода сопоставима, согласно [55], с чувствительностью метода TRAP-ИФА. Метод позволяет количественно определять активность теломеразы в экстрактах клеточных линий и тканей (апробирован на опухолях легкого). Его преимуществом является линейная зависимость сигнала от количества синтезированной теломеразой ДНК в сочетании с высокой производительностью.

Электрохемилюминесцентный метод определения теломеразной активности

Определять теломеразную активность можно и с помощью электрохемилюминесценции (люминесценции при электролизе). В этом методе 5'-биотинилированный праймер удлиняют теломеразой, а затем инкубируют со взвесью магнитных шариков, модифицированных авидином. С иммобилизованной на магнитных шариках ДНК гибридизуют электрохемилюминесцентную пробу (ковалентно связанный с наночастицей золота олигонуклеотид, модифицированный рутений-бис(2,2'-бипиридин)(2,2'-бипиридин-4,4'-дикарбонат)-N-гидроксисукцинимидэфиром. Эти тройные комплексы (магнитный шарик – теломерная

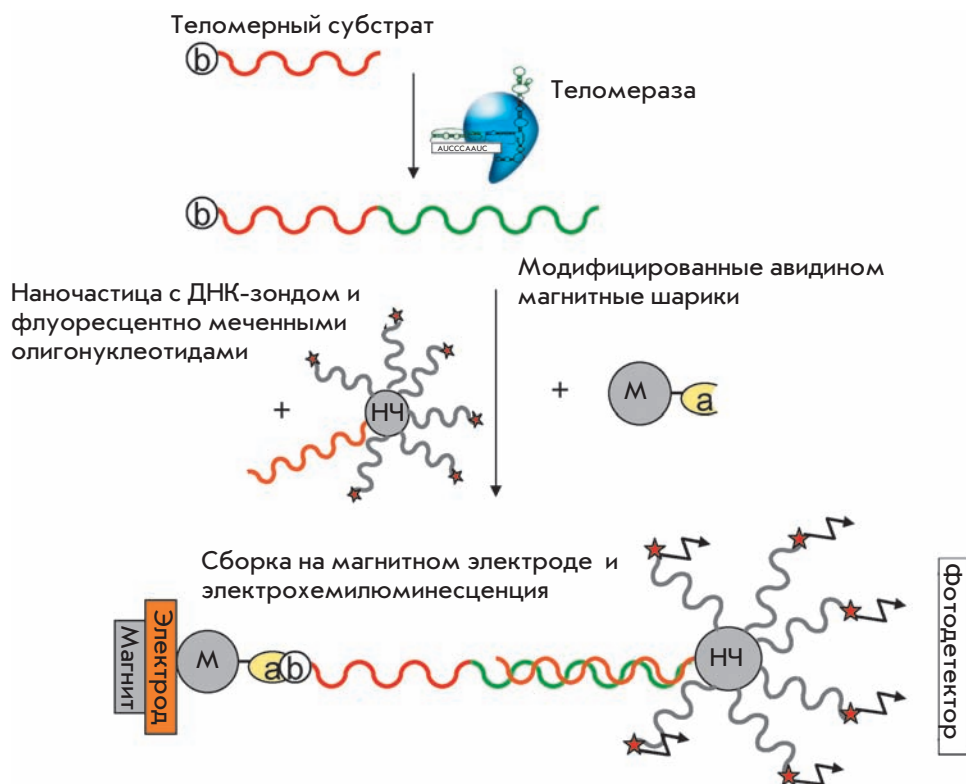


Рис. 17. Схема электрохемилюминесцентного метода определения теломеразной активности [54].

проба – электрохемилюминесцентная проба) промывают и впрыскивают в реакционную кювету, где они примагничиваются к рабочему электроду и при подаче напряжения начинают люминесцировать (рис. 17). Метод позволяет количественно определять активность теломеразы в пробах, содержащих не менее 500 клеток HeLa [56], он обеспечивает достаточно высокое соотношение сигнал/шум благодаря стадии экстракции модифицированными магнитными шариками, но не апробирован на клинических материалах.

Детекция теломеразной активности с помощью FRET и флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения

Метод на основе FRET предназначен для того, чтобы различить синтез одной буквы (непроцессивный метод синтеза) и начало синтеза второго повтора ДНК (условно процессивный метод синтеза) индивидуальными комплексами теломеразы *Tetrahymena thermophila*. FRET определяли с помощью флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения, основанной на явлении отражения электромагнитных волн от границы раздела двух прозрачных сред, которое возникает при условии, что волна падает из среды с более высоким показателем преломления под углом, превышающим угол полного отражения. Интенсивность излучения, проникаю-

щего во вторую среду, уменьшается по экспоненциальному закону, что позволяет выявлять флуоресцентные объекты, возбуждаемые этим излучением, в пограничном слое толщиной ~100 нм с разрешением до 10 нм.

Биотинилированные праймеры $(TG)_8T_2G_4T_2$ связывали на покрытых стрептавидином кварцевых слайдах и обрабатывали содержащим теломеразу экстрактом в присутствии dGTP и ddTTP, обрывающего синтез на втором повторе. В результате образуются детектируемые продукты двух типов. Слайды с продуктами реакции обрабатывали Cu^{2+} -меченым олигонуклеотидом $(Cu^{2+}-CA)_8$, чтобы окрасить Cu^{2+} каждый связанный на слайде праймер за счет комплементарного взаимодействия с нетеломерным участком олигонуклеотида $(TG)_8$. Затем систему обрабатывали комплементарным теломерной последовательности Cu^{5+} -меченым детектирующим олигонуклеотидом $(Cu^{5+}-C_2A_2C_3)$, который более эффективно связывается с более длинным продуктом теломеразы. Фиксируют сигнал FRET между Cu^{2+} и Cu^{5+} [57] (рис. 18). Метод позволяет идентифицировать индивидуальные сигналы от удлинения праймера теломеразой.

Для проверки и нормирования системы использовали меченные Alexa Fluor-488 праймеры трех типов: соответствующие позициям без синтеза, синтезу одной буквы, синтезу второго повтора $((TG)_8T_2G_4T_2$,

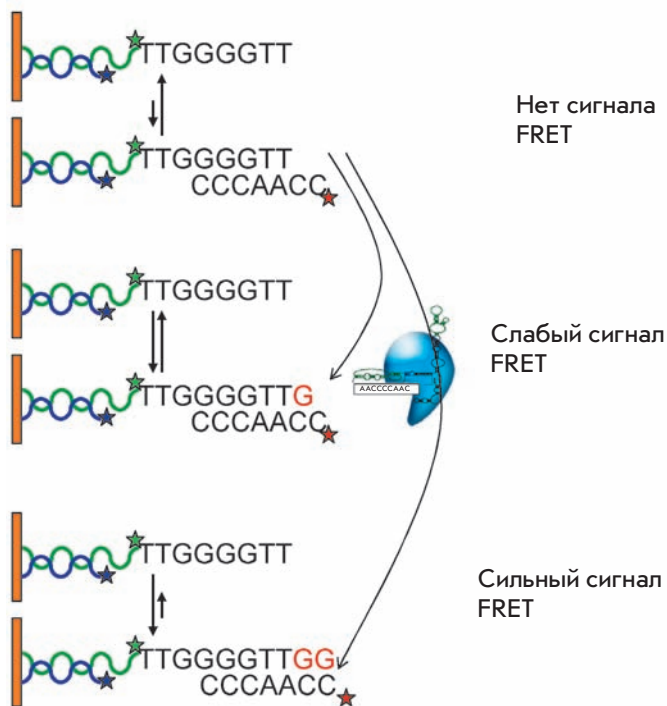


Рис. 18. Детекция теломеразной активности с помощью FRET и флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения [57].

(TG)₈T₂G₄T₂G, (TG)₈T₂G₄T₂G₄T) с 5'-концевым биотином, которые связывались с покрытыми стрептавидином кварцевыми слайдами. Наличие флуорофора Alexa Fluor-488 позволяет определить плотность и локализацию связанных на слайде праймеров [57].

Определение теломеразной активности с помощью FRET и флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения дает возможность детектировать удлинение теломеразой индивидуальных праймеров и может сочетаться с основанными на FRET методами изучения структуры теломеразы. Этим методом можно определить только первые полтора повтора, синтезированные теломеразой, т.е. он не отражает полной активности теломеразы. Метод апробирован только на теломеразе *T. thermophila* и предназначен пока только для решения исследовательских задач.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО УСИЛЕНИЯ СИГНАЛА

Определение активности теломеразы с использованием меченных дигоксигенином комплементарных теломерам олигонуклеотидов

Определение синтезированной теломеразой ДНК с помощью ИФА привлекательно тем, что это неизо-

топный метод. Метод основан на том, что синтезированную теломеразой ДНК гибридизуют с меченным дигоксигенином олигонуклеотидом и определяют полученный комплекс с помощью ИФА, используя конъюгат щелочной фосфатазы с антителом к дигоксигенину (рис. 8). Предел чувствительности метода – 10 аттомоль продукта, что типично для систем с дигоксигенином. При использовании экстрактов клеток линии T293 предел чувствительности составлял 37500 клеток [58], что недостаточно для анализа клинических материалов. Метод определения синтезированной теломеразой ДНК с помощью ИФА далеко не самый чувствительный, но он полностью автоматизирован и оптимизирован для поиска ингибиторов теломеразы.

Электрохимическое определение активности теломеразы с использованием конъюгатов авидина с щелочной фосфатазой

Метод основан на иммуоферментной амплификации сигнала с электрохимической детекцией. Тиолированный олигонуклеотид-субстрат, ковалентно присоединенный к золотому электроду, удлиняется теломеразой в присутствии NTP. Далее проводят ИФА, как и в методе с применением микробаласа кварцевого кристалла, с образованием нерастворимого продукта на поверхности электрода, что и определяют электрохимически (рис. 12). Для детекции используют хронопотенциометрию – метод, основанный на измерении изменения электродного потенциала *E* во времени при контролируемом (постоянном) значении тока электролиза. Чем больше осадка на поверхности электрода, тем сильнее изменение потенциала. Метод позволяет с высокой скоростью количественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий [47]. Чувствительность метода достаточна для определения теломеразной активности в экстракте, соответствующем 1000 клеток линии HeLa.

Определение активности теломеразы с использованием флуориметрического оптосенсора

Этот оптический сенсор основан на флуориметрии (фактически – флуориметр с использованием оптоволокна в системах возбуждения и детекции). Олигонуклеотид, субстрат теломеразы, модифицируется на 3'-конце фосфотиоатом для увеличения аффинности теломер-(олигонуклеотид)связывающего участка hTERT и соответственно скорости теломеразной реакции. Этот праймер ковалентно связывается на поверхности оптического биосенсора, и его удлинение теломеразой отслеживается в реальном времени по включению dUTP, меченного изотиоцианатным производным флуоресцеина (FITC), или уд-

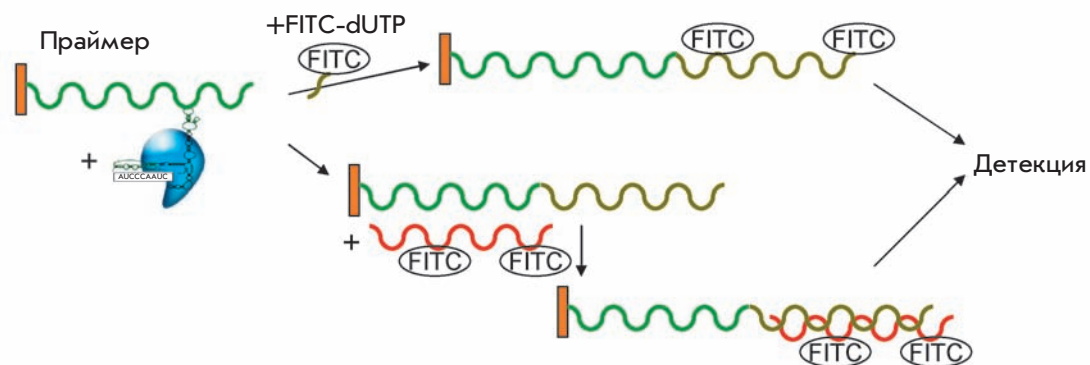
Таблица 2. Краткое сравнение методов определения теломеразной активности

Метод определения теломеразной активности	Чувствительность*	Преимущества	Недостатки**	Ссылка
С помощью прямого включения радиоактивно меченного субстрата	$10^5 - 10^6$	Отсутствие связанных с ПЦР артефактов. Синтезированная теломеразой ДНК видна непосредственно в теле, можно оценивать ее размер и количество.	Низкая чувствительность, необходимость работы с большими количествами радиоактивной метки, длительное время экспозиции.	[43]
Определение синтезированной теломеразой ДНК по изменению поверхностного плазмонного резонанса	20–100	Отсутствие связанных с ПЦР артефактов, без радиоактивной метки, без ПААГ. Информация о кинетике реакции. Возможность детекции сигнала на фоне 1000х избытка теломераза-негативных клеток. Видны связывание и диссоциация теломеразы.	Необходимость в системе BIACORE и биотинилированных праймерах.	[44, 54]
С помощью модифицированных олигонуклеотидов магнитных частиц и ЯМР	10	Отсутствие связанных с ПЦР артефактов, без радиоактивной метки, без ПААГ, очень высокопроизводительный микропланшетный формат.	Нужен ЯМР-спектрометр и проба из наночастиц, ковалентно связанных с олигонуклеотидами.	[46]
С помощью метода микробаланса кварцевого кристалла	3300	Отсутствие связанных с ПЦР артефактов. Высокая чувствительность. Быстрая процедура.	Нужен частотный анализатор и Au-кварцевый кристалл, сложность идентификации артефактных сигналов в случае появления.	[47]
Электрохимически с использованием ферроценинафталиндимиды	100–1000	Отсутствие связанных с ПЦР артефактов. Высокая чувствительность. Быстрая процедура.	Оценивается число свернутых в квадруплекс структур, зависящее не только от общего числа повторов, но и непротонизируемо от длины и расположения отдельных фрагментов ДНК.	[48]
С использованием биобаркода	10	Один из наиболее чувствительных на сегодняшний день методов непосредственного измерения теломеразной активности без амплификации синтезированной теломеразой ДНК.	Нужен модифицированный электрод и наночастицы, покрытые олигонуклеотидами двух типов.	[49]
С использованием оптических блосенсоров	10^5	Без радиоактивности, без ПААГ, без ПЦР.	Нужны фотодиодомодифицированные олигонуклеотиды и специальный оптосенсор. Недостаточная для клинических материалов чувствительность.	[50]
Основанный на квантовых точках	10000/270	Без радиоактивности, без ПААГ, без ПЦР.	Нужны олигонуклеотиды, ковалентно связанные с квантовыми точками. Недостаточная для клинических материалов чувствительность.	[51]
С помощью сенсорного чипа на нанопроводе	100	Возможность проводить большое количество разных анализов образца на одном чипе. Видны связывание и диссоциация теломеразы.	Нужен нанотранзисторный чип и оборудование для его анализа.	[53]
Биоломинесцентный	5	Линейная зависимость сигнала от количества синтезированной теломеразой ДНК. Без радиоактивности, без ПААГ, без ПЦР, высокопроизводительный формат.	Нужны люциферазная система детекции биоломинесценции и люминометр.	[55]
Электрохемилюминесцентный	500	Высокое соотношение сигнал/шум благодаря очистке экстракцией модифицированными магнитными шариками. Высокая чувствительность.	Сложность синтеза пробы, требования к оборудованию.	[56]
С помощью FRET и флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения	1	Высочайшая чувствительность – возможность детектировать удлинение теломеразой индивидуальных праймеров. Возможность сочетания метода с основанными на FRET методами исследования структуры теломеразы.	Метод определяет только первые полтора повтора, синтезированные теломеразой. Апробация сделана только для теломеразы <i>Tetrahymena thermophila</i> .	[57]
С использованием дитоксигенированных меченных комплекментарных теломерам олигонуклеотидов (ИФА)	37500	Количественность, метод автоматизирован.	Недостаточная для клинических материалов чувствительность.	[58]
Электрохимически с использованием конъюгатов авидин-щелочная фосфатаза	3300	Отсутствие связанных с ПЦР артефактов. Высокая чувствительность. Быстрая процедура.	Нужен специально подготовленный электрод, сложность идентификации артефактных сигналов в случае появления.	[47]
С использованием флуориметрического оптосенсора	$10^6 - 10^7$	Без радиоактивности, без ПААГ, без ПЦР.	Нужны фотодиодомодифицированные олигонуклеотиды и опволоконная система детекции флуоресценции. Недостаточная для клинических материалов чувствительность.	[59]

С использованием ДНК-зондов меченых олигонуклеотидов	1000	Без радиоактивности, без ПААГ, без ПЦР. Простая процедура и короткое время анализа.	Не очень высокая специфичность метода, есть фоновый сигнал.	[61]
По пересорачивающемуся в ДНК-зонд теломеразному субстрату	10000	Без радиоактивности, без ПААГ, без ПЦР. Очень простая процедура и короткое время анализа.	Не очень высокие чувствительность и специфичность метода, есть фоновый сигнал.	[60]
TRAP	10	Видны амплификации синтезированной теломеразой ДНК. ПААГ позволяет определить часть артефактов ПЦР. Высокая специфичность метода.	Работа с радиоактивной меткой, необходимость ПААГ. Возможность артефактов ПЦР.	[11]
TRAP с одной клетки	1	Высокая чувствительность. ПААГ позволяет определять часть артефактов ПЦР и качественно судить о процессивности.	Работа с радиоактивной меткой, работа с отдельными клетками, необходимость ПААГ. Возможность артефактов ПЦР.	[13]
TRAP с флуоресцентными праймерами	100	Без радиоактивной метки, ПААГ позволяет определять часть артефактов ПЦР и качественно судить о процессивности.	Необходимость в флуоресцентно меченых праймерах, необходимость ПААГ. Возможность артефактов ПЦР.	[20]
TRAP с флуоресцентным окрашиванием ДНК в теле	10	Без радиоактивной метки. ПААГ позволяет определять часть артефактов ПЦР и качественно судить о процессивности.	Необходимость ПААГ. Возможность артефактов ПЦР. Большинство интеркалирующих флуоресцентных красителей мутагенны.	[16, 18]
TRAP с окрашиванием ДНК в теле нитритом серебра	10	Без радиоактивной метки. ПААГ позволяет определять часть артефактов ПЦР и качественно судить о процессивности.	Необходимость ПААГ. Возможность артефактов ПЦР. Увеличенная трудоемкость.	[17]
TRAP с анализом методом сцинтилляционного сближения	10	Без радиоактивности, без ПААГ, высокопроизводительный микропланшетный формат. Легкая оценка количества.	Необходимость в $[^3\text{H}]\text{TTP}$ и биотинилированных праймерах. Работа с тритием. Возможность артефактов ПЦР.	[27]
TRAP с детекцией методом «защиты гибридизации»	10	Без радиоактивности, без ПААГ, высокопроизводительный микропланшетный формат. Легкая оценка количества.	Требуются акридин-меченные пробы. Возможность артефактов ПЦР.	[28]
TRAP с праймерами-амплифлуорами	10-50	Без радиоактивности, без ПААГ, высокопроизводительный формат. Различное мечение амплификатов синтезированной теломеразой ДНК и ПЦР-контроля.	Возможность артефактов ПЦР. Требуются амплифлуоры.	[22]
TRAP в сочетании с иммуноферментным анализом	10	Без радиоактивности, без ПААГ, высокопроизводительный микропланшетный формат.	Возможность артефактов ПЦР и ИФА.	[29]
TRAP с праймерами с резонансным переносом энергии (FRET)	10	Без радиоактивности, без ПААГ, высокопроизводительный микропланшетный формат.	Неодинаковый учет при количественной оценке первых и последующих повторов, построенных теломеразой. Возможность артефактов ПЦР. Требуются специальные флуорофоры.	[26]
TRAP на микрочипах	10	Без радиоактивности, без ПААГ, малые реакционные объемы, высокопроизводительный микропланшетный формат. Легкая оценка количества.	Нужны чипы и прибор для их чтения.	[35]
TRAP с ПЦР в реальном времени	50	Без радиоактивности, без ПААГ, высокопроизводительный микропланшетный формат. Легкая оценка количества. Возможно различное мечение амплифлуорами амплификатов синтезированной теломеразой ДНК и ПЦР-контроля.	Нужен амплификатор для ПЦР в реальном времени. Возможность артефактов ПЦР. Сложность определения артефактов ПЦР.	[32, 33]
<i>In situ</i> TRAP	1	Метод дает информацию о активности теломеразы в отдельных клетках и некоторую информацию о внутриклеточной локализации активности.	Сложная процедура, низкопроизводительная, нужен флуоресцентный микроскоп. Метод оптимизирован только для анализа клинических препаратов и клеточных линий.	[36]
TRAP с транскрипционной амплификацией	10	Изотермическая амплификация, отсутствие артефактов ПЦР, детекция без ПААГ, высокопроизводительный формат.	Требуются акридин-меченные пробы. Возможность артефактов транскрипционной амплификации. Повышенные требования к чистоте (отсутствию РНК-аз) из-за транскрипционной амплификации.	[42]

*Минимальное число клеток теломеразы-положительных клеточных линий, в котором возможно определение активности активностью.
 **Все методы без ПААГ (кроме определения теломеразной активности с помощью FRET и флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения) оценивают активность, но не процессивность теломеразы.

Рис. 19. Схема получения флуоресцентно меченной синтезированной теломеразой ДНК для детекции флуориметрическим оптосенсором [59].



линенную цепь определяют с помощью гибридизации FITC-меченной комплементарной ДНК-пробы ((ССААТС)₄-FITC) (рис. 19). Этот метод не требует ПЦР-амплификации и дополнительных шагов очистки [59]. Кроме того, сравнили эффективность работы теломеразы в присутствии обычных dNTP и в присутствии FITC-меченного dUTP. Для этого синтезированную теломеразой ДНК в присутствии FITC-меченного dUTP метили FITC-меченной комплементарной ДНК-пробой. Оказалось, что теломераза хуже работает в присутствии FITC-меченного dUTP [59]. Метод позволяет количественно определять активность теломеразы, но его чувствительность не превышает 10⁶–10⁷ клеток, что недостаточно для анализа клинических материалов. Кроме того, в этом методе используется несерийная система детекции флуоресценции.

Определение активности теломеразы с использованием ДНКзимов

ДНКзимы – фрагменты ДНК, обладающие ферментативной активностью.

Существует несколько вариантов использования ДНКзимов при анализе теломеразы. Во-первых, субстрат теломеразы может иметь на 5'-конце шпильку, которая при удлинении субстрата пересворачивается, образуя каталитическую структуру (рис. 20А). При этом одна цепь исходной шпильки образует дуплекс с *de novo* синтезированными теломерными повторами, а вторая, в присутствии молекулы гемина, формирует квадруплекс с включенной в него молекулой гемина, обладающий пероксидазной активностью. Этот комплекс катализирует окисление 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин)-6-сульфоновой кислоты (ABTS) в присутствии H₂O₂, что приводит к накоплению цветного продукта (рис. 20). Чувствительность этого метода составляет примерно 10000 клеток линии HeLa при продолжительности анализа около 8 мин [60]. Следует отметить медленное изменение цвета экстракта контрольных клеток после

термической обработки, что, по мнению авторов, связано с неспецифической сорбцией гемина на компонентах реакционной смеси. Этот метод отражает число удлинённых молекул субстрата, но не учитывает длину создаваемой теломеразой цепи.

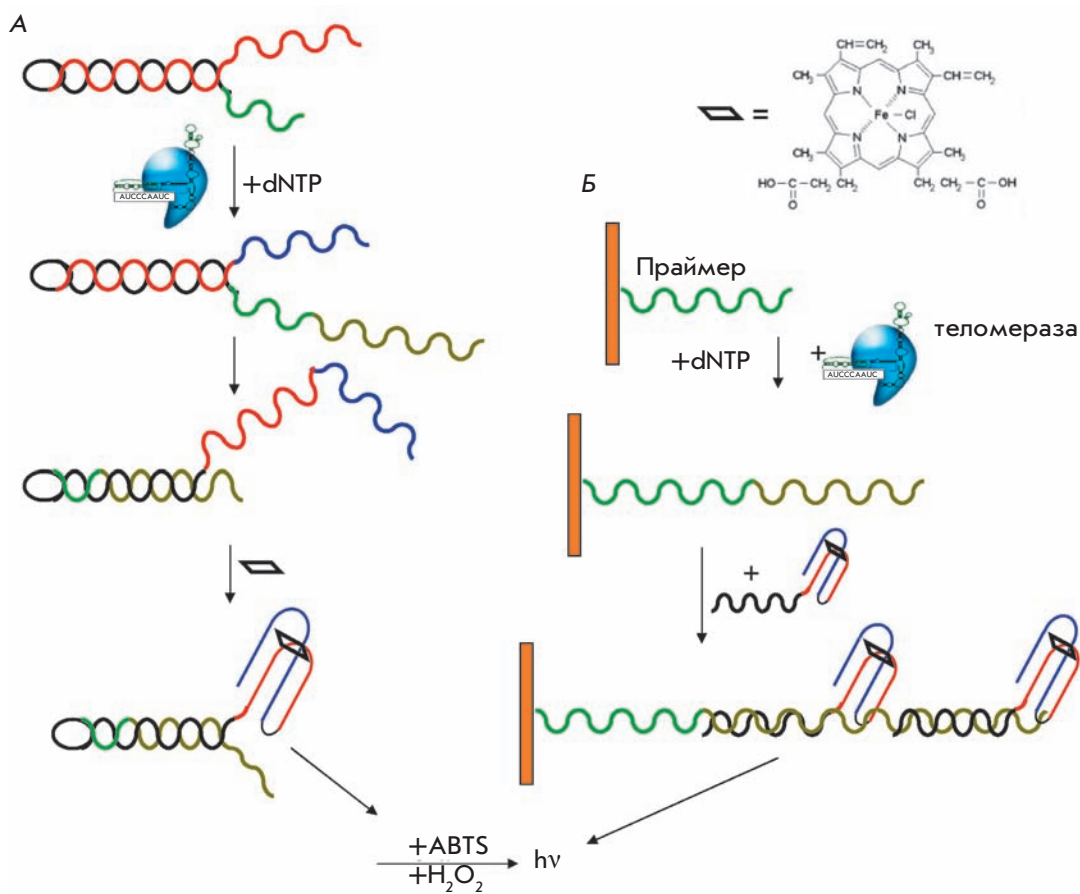
Аналогично можно использовать ДНКзим, ковалентно связанный с антисмысловым олигонуклеотидом к синтезированной теломеразой ДНК [61] (рис. 20Б). Фактически это ИФА, где к зонду уже ковалентно присоединен фермент. Чувствительность этой модификации составляет около 1000 клеток линии HeLa при меньшем фоне. К недостаткам этих методов можно отнести невысокую чувствительность и специфичность, а также наличие фонового сигнала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время существует ряд методов определения теломеразной активности в самых разных образцах: экстрактах клеток, тканей, смешанных популяций клеток. Все методы можно разбить на две группы – методы с непосредственной детекцией синтезированной теломеразой ДНК и методы с различными схемами усиления, каждый из которых обладает своими преимуществами и недостатками. Сравнение всех этих методов приведено в табл. 2.

Если рассмотреть все методы, то можно выделить ряд новых систем, сопоставимых по чувствительности с наиболее распространенным на сегодня методом TRAP. Они избавлены от артефактов, связанных с амплификацией, и обладают высокой скоростью анализа при высокой чувствительности. При этом они имеют ряд недостатков, в том числе и высокие требования к специфическим расходным материалам и оборудованию, так что выбор методики в каждом конкретном случае может определяться доступностью оборудования и реактивов. В ряде методов сложно отделить специфические сигналы от неспецифических. В большинстве методов оценивается только активность, но не процессивность теломеразы. Зачастую они не дают информации о распределении

Рис. 20. Схема двух вариантов определения активности теломеразы с использованием ДНКзимов [60, 61] (А, Б).



синтезированной теломеразой ДНК по длине. Некоторые методы узкоспециализированные. Например, метод с определением синтезированной теломеразой ДНК с использованием дигоксигенин-меченных комплементарных теломерам олигонуклеотидов (ИФА) без ПЦР далеко не самый чувствительный, но полностью автоматизированный и оптимизированный для поиска ингибиторов теломеразы. Определение теломеразной активности с помощью FRET и флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения дает возможность детектировать удлинение теломеразой индивидуальных праймеров, может со-

четаться с основанными на FRET методами исследования структуры теломеразы, но при этом позволяет детектировать только первые полтора повтора, синтезированные теломеразой, и предназначено для решения исследовательских задач. ●

Работа поддержана государственным контрактом № 02.740.11.0706, Российским фондом фундаментальных исследований (грант 08-04-01220-а) и Федеральным агентством по образованию (государственные контракты П1390 и П800).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hayflick L., Moorhead P.S. // Exp. Cell Res. 1961. V. 25. P. 585–621.
- Olovnikov A.M. // J. Theor. Biol. 1973. V. 41(1). P. 181–190.
- Blackburn E.H. // Cell. 2001. V. 106(6). P. 661–673.
- Pandita T.K., Hunt C.R., Sharma G.G., Yang Q. // Cell Mol. Life Sci. 2007. V. 64(2). P. 131–138.
- Greider C.W., Blackburn E.H. // Cell. 1985. V. 43(2). P. 405–413.
- Blackburn E.H. // Nature. 1991. V. 350(6319). P. 569–573.
- Maida Y., Yasukawa M., Furuuchi M., Lassmann T., Possemato R., Okamoto N., Kasim V., Hayashizaki Y., Hahn W.C., Masutomi K. // Nature. 2009. V. 461(7261). P. 230–235.
- Pasrija T., Srinivasan R., Behera D., Majumdar S. // Eur. J. Cancer. 2007. V. 43(9). P. 1476–1482.
- Kedde M., le Sage C., Duursma A., Zlotorynski E., van Leeuwen B., Nijkamp W., Beijersbergen R., Agami R. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281(52). P. 40503–40514.
- Скворцов Д.А., Рубцова М.П., Зверева М.Э., Киселев Ф.Л., Донцова О.А. // Acta Naturae. 2009. V. 1(1). С. 51–67.
- Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. // Science. 1994. V. 266(5193). P. 2011–2015.

12. Saldanha S.N., Andrews L.G., Tollefsbol T.O. // *Anal. Biochem.* 2003. V. 315(1). P. 1–21.
13. Wright W.E., Shay J.W., Piatyszek M.A. // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23(18). P. 3794–3795.
14. Скворцов Д.А., Гаспарьян Н.М., Рубцова М.П., Зверева М.Э., Федорова М.Д., Павлова Л.С., Богданов А.А., Донцова О.А., Киселев Ф.Л. // *ДАН.* 2006. Т. 408(4). С. 556–559.
15. Gomez D., Mergny J.L., Riou J.F. // *Cancer Res.* 2002. V. 62(12). P. 3365–3368.
16. Gan Y., Lu J., Johnson A., Wientjes M.G., Schuller D.E., Au J.L. // *Pharm. Res.* 2001. V. 18(4). P. 488–493.
17. Dalla Torre C.A., Maciel R.M., Pinheiro N.A., Andrade J.A., De Toledo S.R., Villa L.L., Cerutti J.M. // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002. V. 35(1). P. 65–68.
18. Holt S.E., Norton J.C., Wright W.E., Shay J.W. // *Methods Cell. Sci.* 1996. V. 18. P. 237–248.
19. Скворцов Д.А., Зверева М.Э., Павлова Л.С., Петренко А.А., Киселев Ф.Л., Донцова О.А. // *Вестник МГУ.* 2010. Т. 65(3). С. 165–169.
20. Aldous W.K., Grabill N.R. // *Diagn. Mol. Pathol.* 1997. V. 6(2). P. 102–110.
21. Gollahon L.S., Holt S.E. // *Cancer Lett.* 2000. V. 159(2). P. 141–149.
22. Uehara H., Nardone G., Nazarenko I., Hohman R.J. // *Bio-techniques.* 1999. V. 26(3). P. 552–558.
23. Szatmari I., Tokes S., Dunn C.B., Bardos T.J., Aradi J. // *Anal. Biochem.* 2000. V. 282(1). P. 80–88.
24. Szatmari I., Aradi J. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29(2). P. E3.
25. Bazin H., Preaudat M., Trinquet E., Mathis G. // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2001. V. 57(11). P. 2197–2211.
26. Gabourdes M., Bourguine V., Mathis G., Bazin H., Alpha-Bazin B. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 333(1). P. 105–113.
27. Savoysky E., Akamatsu K., Tsuchiya M., Yamazaki T. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24(6). P. 1175–1176.
28. Hirose M., Abe-Hashimoto J., Ogura K., Tahara H., Ide T., Yoshimura T. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1997. V. 123(6). P. 337–344.
29. Mayfield M.P., Shah T., Flannigan G.M., Hamilton Stewart P.A., Bibby M.C. // *Int. J. Mol. Med.* 1998. V. 1(5). P. 835–840.
30. Hoos A., Hepp H.H., Kaul S., Ahlert T., Bastert G., Wallwieser D. // *Int. J. Cancer.* 1998. V. 79(1). P. 8–12.
31. Chen L., Huang J., Meng F., Zhou N. // *Anal. Sci.* 2010. V. 26(5). P. 535–538.
32. Hou M., Xu D., Bjorkholm M., Gruber A. // *Clin. Chem.* 2001. V. 47(3). P. 519–524.
33. Elmore L.W., Forsythe H.L., Ferreira-Gonzalez A., Garrett C.T., Clark G.M., Holt S.E. // *Diagn. Mol. Pathol.* 2002. V. 11(3). P. 177–185.
34. Kong D., Jin Y., Yin Y., Mi H., Shen H. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. V. 388(3). P. 699–709.
35. Heller-Uszynska K., Kilian A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 323(2). P. 465–472.
36. Ohyashiki K., Ohyashiki J.H., Nishimaki J., Toyama K., Ebihara Y., Kato H., Wright W.E., Shay J.W. // *Cancer Res.* 1997. V. 57(11). P. 2100–2103.
37. Yahata N., Ohyashiki K., Ohyashiki J.H., Iwama H., Hayashi S., Ando K., Hirano T., Tsuchida T., Kato H., Shay J.W., et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1998. V. 90(9). P. 684–690.
38. Ohyashiki K., Yahata N., Ohyashiki J.H., Iwama H., Hayashi S., Ando K., Aizawa T., Ito T., Miki M., Ebihara Y. // *Cancer.* 1998. V. 83(12). P. 2554–2560.
39. Dejmek A., Yahata N., Ohyashiki K., Kakihana M., Hirano T., Kawate N., Kato H., Ebihara Y. // *Cancer.* 2000. V. 90(2). P. 117–125.
40. Dejmek A., Yahata N., Ohyashiki K., Ebihara Y., Kakihana M., Hirano T., Kawate N., Kato H. // *Diagn. Cytopathol.* 2001. V. 24(1). P. 11–15.
41. Youssef N., Paradis V., Ferlicot S., Bedossa P. // *J. Pathol.* 2001. V. 194(4). P. 459–465.
42. Hirose M., Abe-Hashimoto J., Tahara H., Ide T., Yoshimura T. // *Clin. Chem.* 1998. V. 44(12). P. 2446–2452.
43. Blackburn E.H., Greider C.W., Henderson E., Lee M.S., Shampay J., Shippen-Lentz D. // *Genome.* 1989. V. 31(2). P. 553–560.
44. Maesawa C., Inaba T., Sato H., Iijima S., Ishida K., Terashima M., Sato R., Suzuki M., Yashima A., Ogasawara S., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31(2). P. E4–4.
45. Rad'ko S.P., Voronina S.A., Gromov A.V., Gnedenko O.V., Bodoev N.V., Ivanov A.S., Yarygin K.N. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009. V. 147(6). P. 746–749.
46. Grimm J., Perez J.M., Josephson L., Weissleder R. // *Cancer Res.* 2004. V. 64(2). P. 639–634.
47. Pavlov V., Willner I., Dishon A., Kotler M. // *Biosens. Bioelectron.* 2004. V. 20(5). P. 1011–1021.
48. Sato S., Kondo H., Nojima T., Takenaka S. // *Anal. Chem.* 2005. V. 77(22). P. 7304–7309.
49. Li Y., Liu B., Li X., Wei Q. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 25(11). P. 2543–2547.
50. Schmidt P.M., Matthes E., Scheller F.W., Bienert M., Lehmann C., Ehrlich A., Bier F.F. // *Biol. Chem.* 2002. V. 383(10). P. 1659–1666.
51. Patolsky F., Gill R., Weizmann Y., Mokari T., Banin U., Willner I. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125(46). P. 13918–13919.
52. Sharon E., Freeman R., Willner I. // *Anal. Chem.* 2010. V. 82(17). P. 7073–7077.
53. Zheng G., Patolsky F., Cui Y., Wang W.U., Lieber C.M. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23(10). P. 1294–1301.
54. Sharon E., Freeman R., Riskin M., Gil N., Tzfati Y., Willner I. // *Anal. Chem.* 2010. Sep 17. [Epub ahead of print]
55. Xu S.Q., He M., Yu H.P., Wang X.Y., Tan X.L., Lu B., Sun X., Zhou Y.K., Yao Q.F., Xu Y.J., et al. // *Clin. Chem.* 2002. V. 48(7). P. 1016–1020.
56. Zhou X., Xing D., Zhu D., Jia L. // *Anal. Chem.* 2009. V. 81(1). P. 255–261.
57. Wu J.Y., Stone M.D., Zhuang X. // *Nucl. Acids Res.* V. 38(3). P. e16.
58. Kha H., Zhou W., Chen K., Karan-Tamir B., San Miguel T., Zeni L., Kearns K., Mladenovic A., Rasnow B., Robinson M., et al. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 331(2). P. 230–234.
59. Schmidt P.M., Lehmann C., Matthes E., Bier F.F. // *Biosens. Bioelectron.* 2002. V. 17(11–12). P. 1081–1087.
60. Xiao Y., Pavlov V., Niazov T., Dishon A., Kotler M., Willner I. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126(24). P. 7430–7431.
61. Pavlov V., Xiao Y., Gill R., Dishon A., Kotler M., Willner I. // *Anal. Chem.* 2004. V. 76(7). P. 2152–2156.

ИННОВАЦИОННАЯ РОССИЯ

дискуссионный клуб

Мы формируем диалог между студентами, учеными, преподавателями, бизнесменами, менеджерами, инноваторами, инвесторами, дизайнерами, искусствоведами, архитекторами, фотографами – всеми социально-активными людьми.

Узнай больше
на WWW.STRF.RU

Мы приглашаем на наши мероприятия
всех, кому есть что сказать, кто хочет
поделиться своими идеями

Тел.: +7 (495) 930-87-07, 930 8850
E-mail: seminar@strf.ru

УДК 577.2

Пространственная структура и динамика трансмембранного домена белка-предшественника β -амилоида

К. Д. Надеждин, О. В. Бочарова, Э. В. Бочаров*, А. С. Арсеньев

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

*E-mail: bon@nmr.ru

Поступила в редакцию 28.10.2010 г.

РЕФЕРАТ Для адекватной терапии болезни Альцгеймера, которая поражает людей во всем мире независимо от национальности и социально-экономического статуса, необходимо понимать молекулярные основы патогенеза этого заболевания. Амилоидный β -пептид, формирующий амилоидные бляшки в головном мозге при болезни Альцгеймера, образуется в результате последовательного расщепления мембранного белка-предшественника β -амилоида (amyloid precursor protein – APP). Более половины мутаций APP, обнаруженных при семейных формах болезни Альцгеймера, локализованы в его трансмембранном домене. Патогенные мутации, как предполагают, влияют на структурно-динамические свойства трансмембранного домена APP, изменяя его конформационную стабильность и/или латеральную димеризацию. В настоящей работе методами ЯМР-спектроскопии в среде, имитирующей мембранное окружение, – детергентных мицеллах, определены пространственная структура и динамика рекомбинантного пептида, соответствующего фрагменту APP Glu686–Lys726, который включает трансмембранный домен APP с прилегающим N-концевым примембранным участком. Структура, полученная в мицеллах додецилфосфохолина, представляет собой две α -спирали: короткая амфифильная примембранная Lys687–Asp694 и длинная трансмембранная Gly700–Leu723, соединенные подвижным петлевым участком. В районе спаренных остатков Gly708–Gly709 наблюдается небольшое искривление трансмембранной α -спирали. Под петлевым участком в области контакта примембранной α -спирали с поверхностью мембраны рядом с N-концом трансмембранной α -спирали, по-видимому, образуется гидрофобная полость, предназначенная для взаимодействия APP с холестерином.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Альцгеймера, белок-предшественник β -амилоида, трансмембранный домен, ЯМР-спектроскопия, пространственная структура, динамика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ APP – белок-предшественник β -амилоида (amyloid precursor protein); A β – амилоидный β -пептид; TM – трансмембранный (transmembrane); JM – примембранный (juxtamembrane), APP_{jmtm} – фрагмент APP₆₈₆₋₇₂₆; ДФХ – додецилфосфохолин; ДСК – доксилстеариновая кислота; ЯЭО (NOE) – ядерный эффект Оверхаузера (nuclear Overhauser effect); NOESY – ЯМР-спектроскопия ЯЭО; HSQC – гетероядерная одноквантовая корреляция.

ВВЕДЕНИЕ

Более века назад немецкий врач А. Альцгеймер описал дегенеративное заболевание головного мозга, проявляющееся в избирательной дегенерации нейронов в участках коры головного мозга, ответственных за когнитивное восприятие и память [1]. Возможно как наследование заболевания, так и его спорадическое развитие, причем в раннем возрасте обычно проявляются наследственные, так называемые семейные формы болезни Альцгеймера. Несмотря на определенный прогресс в изучении молекулярных основ патогенеза болезни Альцгеймера [2], современная терапия может лишь замедлить прогрессирование заболевания, но не излечить от него.

По мере развития болезни в местах контакта нейронов вне нервных клеток накапливается амилоидный β -пептид (A β), который собирается в упорядоченные тяжи, фибриллы, образующие так называемые амилоидные бляшки [1]. Присутствие гидрофобных белковых агрегатов приводит к нарушению передачи нервного импульса [1, 3, 4]. A β образуется в результате последовательного расщепления мембранного гликопротеина, предшественника β -амилоида (amyloid precursor protein – APP) β - и γ -секретазами [1, 5]. Недавно показано, что A β обладает мощной антимикробной активностью и, возможно, входит в систему врожденного иммунитета в нервной системе человека [6]. В организме A β вырабатывается в небольших

количествах и имеет длину от 38 до 43 а.о., при этом наиболее распространенные изоформы состоят из 40 и 42 а.о. [1, 3, 4]. Низкое в норме количественное соотношение пептидов $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ (около 1/9) сильно возрастает при болезни Альцгеймера, что приводит к появлению амилоидных бляшек, в основе образования которых лежит структурное изменение $A\beta$ [1, 3, 4]. В то же время ряд экспериментальных данных свидетельствует о том, что олигомерные формы $A\beta$ (в том числе внутриклеточные) могут оказывать нейротоксичный эффект еще до формирования фибрилл и бляшек [1, 3, 4].

APP димеризуется в плазматической мембране и имеет многодоменную структуру интегрального битопного белка [7]. При семейных формах болезни Альцгеймера более половины всех мутаций в APP приходится на его трансмембранный (ТМ) домен и примембранные участки [8, 9]. На сегодняшний день выдвинута гипотеза о том, что эти патогенные мутации влияют на латеральную димеризацию APP в мембране, изменяя конформацию димера и/или его стабильность, что рассматривается как вероятная причина альтернативного расщепления APP γ -секретазой в мембране и преобладания патогенного $A\beta_{1-42}$ над $A\beta_{1-40}$ [9–11]. Вместе с тем показано, что ТМ-домен APP и его примембранные участки специфически взаимодействуют с мембранным окружением, в частности с холестерином, а также с катионами металлов Cu^{2+} и Zn^{2+} , что может влиять на структурно-динамические свойства и димеризацию APP [12–15]. Таким образом, для понимания молекулярных механизмов патогенеза болезни Альцгеймера необходимо установить пространственную организацию не только пептидов $A\beta$ и их агрегатов, но и самого белка APP, и его ТМ-домена в частности. Тем не менее, несмотря на определенные успехи в структурно-динамических исследованиях амилоидных пептидов $A\beta$, на сегодняшний день существуют только теоретические пространственные модели ТМ-домена APP и его мутантных патогенных форм. В настоящей работе методами гетероядерной ЯМР-спектроскопии в мембраноподобной среде установлена пространственная структура и описана динамика ТМ-домена APP с примембранным (juxtamembrane – JM) участком, встроенного в виде мономера в детергентные мицеллы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление ЯМР-образцов ТМ-домена APP в мембраноподобной среде

Необходимые для ЯМР-исследований количества изотопно-меченного по ядрам ^{15}N и ^{13}C образца рекомбинантного пептида APPjmtm, соответствующего

фрагменту APP Gln686–Lys726 с дополнительными N-концевыми остатками Gly–Ser, оставшимися после расщепления гибридного белка тромбином, получены по методике, описанной в [16]. Чистоту препаратов контролировали с помощью спектров $^1H/^{15}N$ -HSQC изотопно-меченных APPjmtm, растворенных в 500 мкл смеси хлороформ–метанол–вода 5 : 5 : 1 с концентрацией пептида 0.3 мМ. На основе скрининга состава мембраномоделирующей среды для последующих структурных ЯМР-исследований APPjmtm были выбраны детергентные мицеллы из додецилфосфохолина (ДФХ) [16]. Сухие препараты APPjmtm и ДФХ растворяли в смеси трифторэтанол–вода 1 : 1, озвучивали в течение нескольких минут в ультразвуковой бане, лиофилизировали и растворяли в 20 мМ ацетатном буфере (pH 5.0, 5% D_2O). Для предотвращения заражения бактериями в образцы добавляли 0.05 мМ NaN_3 , а для ингибирования фосфолипаз – 1 мМ EDTA. Для большей однородности размера мицелл проводили несколько циклов замораживания и нагревания до 40–45°C с последующим озвучиванием в ультразвуковой бане для достижения полной прозрачности раствора. Все образцы готовили из расчета 0.3–1 мМ APPjmtm в 400 мкл раствора мицелл с молярным соотношением пептид–детергент 1 : 70, что обеспечивает содержание примерно одного пептида на мицеллу, при этом концентрация ДФХ была в несколько раз выше критической концентрации мицеллообразования (~1 мМ). Приготовленные образцы помещали в ЯМР-ампулы Shigemi со стеклянным плунжером, качество образцов оценивали при помощи двухмерных ЯМР-спектров $^1H/^{15}N$ -HSQC. Варьирование pH и температуры показало, что лучшие с точки зрения разрешения сигналов ЯМР-спектры APPjmtm, солюбилизованного в мицеллах ДФХ, получаются при pH 4.3–5.3 и температуре 40–50°C.

ЯМР-спектроскопия ТМ-домена APP в мембраноподобной среде

ЯМР-спектры APPjmtm, солюбилизованного в мицеллах ДФХ при pH 4.6 и 45°C, получены на снабженных криодатчиками спектрометрах AVANCE III (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Германия) с рабочими частотами на протонах 600 и 800 МГц. Спектры обрабатывали в программе TOPSPIN 3.0 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Германия). ЯМР-спектры анализировали с использованием программы CARRA [17]. Для отнесения 1H -, ^{13}C - и ^{15}N -резонансов пептида и получения структурной информации (отнесение и интегрирование кросс-пиков ЯЭО) использовали набор из двух- и трехмерных спектров: $^1H/^{15}N$ -HSQC, $^1H/^{13}C$ -HSQC; $^1H/^{13}C/^{15}N$ -HNCA, $^1H/^{13}C/^{15}N$ -HN(CO)CA, $^1H/^{15}N$ -HNHA, $^1H/^{13}C/^{15}N$ -HNCO, $^1H/^{15}N$ -NOESY-HSQC, $^1H/^{13}C$ -TOCSY-HSQC, $^1H/^{13}C$ -NOESY-HSQC [18]. Ин-

формация о внутримолекулярной динамике пептида получена на основе анализа ^{15}N -релаксационных данных. Для этого значения гетероядерного $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ ЯЭО, времена продольной (T_1) и поперечной (T_2) релаксации, а также время вращательной корреляции (τ_R) для ^{15}N -меченного образца APPjmtm измеряли по методике, описанной в [19]. Значения времен обмена амидных протонов основной цепи пептида на дейтерий растворителя оценивали по изменению интенсивностей сигналов в наборе спектров $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC, последовательно накопленных через 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18 и 24 ч для растворенного в D_2O предварительно лиофилизированного образца APPjmtm, встроенного в мицеллы. Степень пространственной удаленности аминокислотного остатка от поверхности и центра мицеллы определяли из уширения сигналов от амидных групп APPjmtm в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC при последовательном добавлении парамагнитных спиновых меток 5- и 16-доксилстеариновых кислот (5- и 16-ДСК) соответственно, в соотношении 0,5, 1 и 2 метки на одну мицеллу ДФХ. Остатки APPjmtm, участвующие в связывании холестерина, идентифицировали, анализируя изменения обобщенных химических сдвигов $\Delta\delta_{[\text{HN}]}$ (вычисляемых как квадратный корень суммы квадратов изменений химических сдвигов сигналов ^1H ($\Delta\delta_{^1\text{H}}$) и ^{15}N ($\Delta\delta_{^{15}\text{N}}/5$) [13]) кросс-пиков амидных групп в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC, вызванных добавлением холестерилгемисукцината (аналог холестерина) из расчета одна молекула гемисукцината на одну мицеллу ДФХ.

Расчет пространственной структуры ТМ-домена APP

Пространственная структура APPjmtm получена по стандартной методике [18]. Расчет пространственной структуры по данным спектроскопии ЯМР осуществлен в программе CYANA 2.1 [20] с использованием метода молекулярной динамики в пространстве торсионных углов и алгоритма “моделируемого отжига” (simulated annealing). Ограничения на межпротонные расстояния, используемые при расчете структуры, получены из объемов кросс-пиков ЯЭО в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC и $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC, накопленных со временем смешивания $t_m = 80$ мс. Ограничения на двугранные углы получены из значений ^1H , ^{15}N и ^{13}C химических сдвигов NH-, CαH- и CO-групп APPjmtm в программе TALOS [21]. Ограничения на водородные связи добавлены после предварительного расчета структуры из анализа пространственной близости амидных протонов и атомов кислорода основной цепи APPjmtm согласно критерию для углов $140^\circ < \text{NHO} < 180^\circ$ и $130^\circ < \text{COH} < 170^\circ$ и для расстояний $1.9 \text{ \AA} \leq d(\text{O}, \text{H}^{\text{N}}) \leq 2.3 \text{ \AA}$, $3.0 \text{ \AA} \leq d(\text{O}, \text{N}) \leq 3.4 \text{ \AA}$, $3.2 \text{ \AA} \leq d(\text{C}, \text{H}^{\text{N}}) \leq 3.6 \text{ \AA}$ [22]. В результате

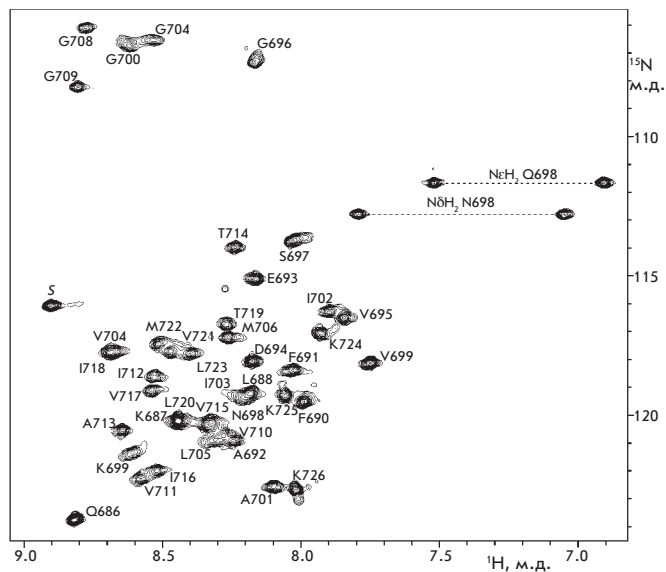


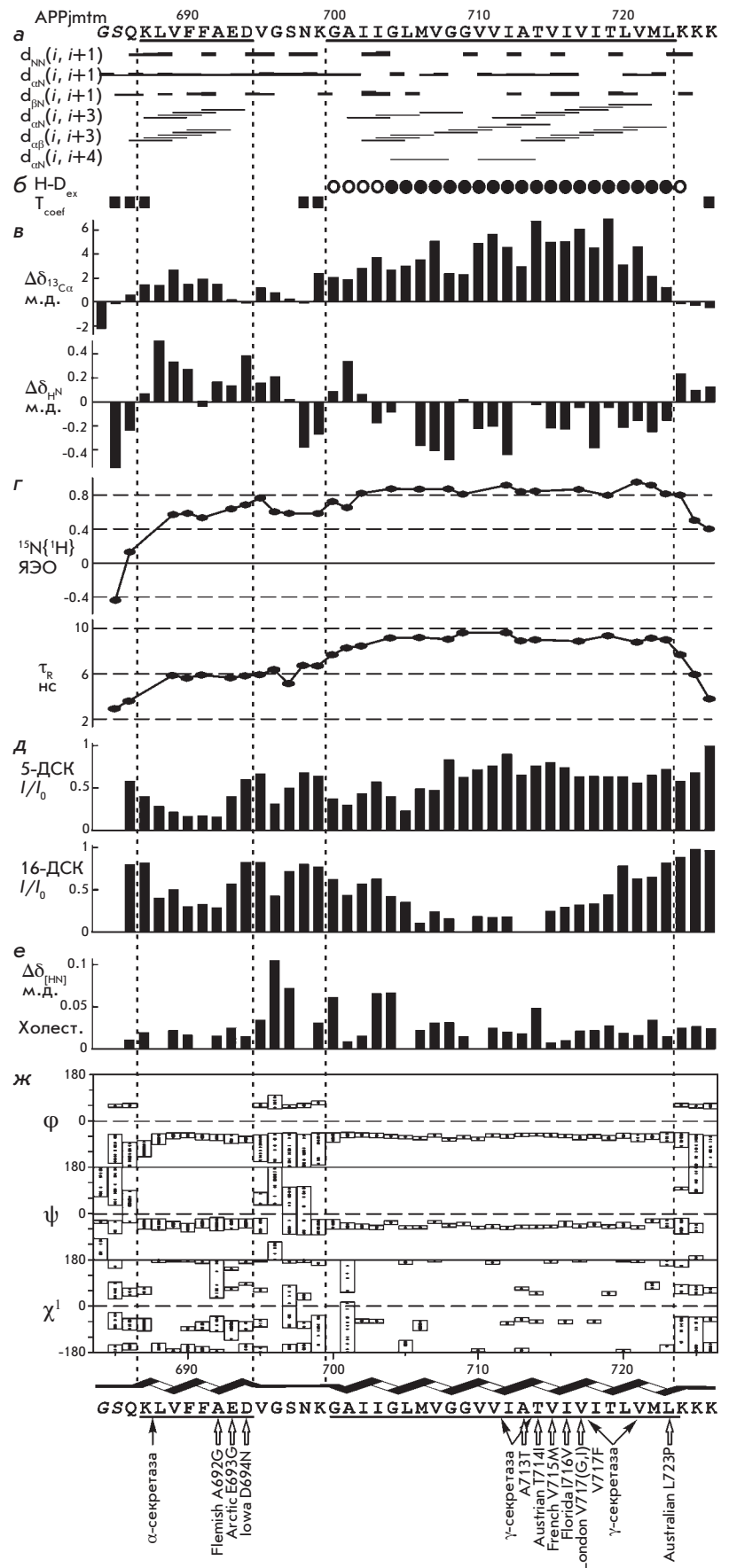
Рис. 1. Гетероядерный ЯМР-спектр $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC рекомбинантного totally $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -меченного пептида APPjmtm, солюбилизованного в водной суспензии мицелл ДФХ с молярным отношением пептид–детергент 1 : 70, pH 4.6, 45°C. Приведено отнесение сигналов от ^{15}NH -групп APPjmtm.

на основе верхних ограничений на межпротонные расстояния, на двугранные углы ϕ , ψ и χ^1 , на водородные связи с учетом стереоспецифического отнесения групп пептида рассчитан набор из 100 структур APPjmtm, из которых в качестве репрезентативных выбраны 20 структур с наименьшей штрафной функцией. Анализ и визуализация рассчитанных структур APPjmtm были проведены с помощью программ CYANA и MOLMOL [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантный пептид APPjmtm, содержащий ТМ-домен APP с прилегающим N-концевым приемлемым участком, изучали методами гетероядерной ЯМР-спектроскопии в мембраноподобной среде в виде водной суспензии мицелл ДФХ с молярным соотношением пептид–детергент 1 : 70 (соответствующим примерно одному пептиду на мицеллу) при pH 4.6 и 45°C. Интересно, что APP расщепляется в клеточных эндосомах со значением pH около 5 [13]. Образцы APPjmtm в мицеллах ДФХ были стабильными при 45°C в течение месяца, что приемлемо для структурных ЯМР-исследований. В спектре $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC (рис. 1) общее количество кросс-пиков от амидных групп совпадало с ожидаемым, исходя из первичной структуры APPjmtm. Это указывает на отсутствие медленного в шкале ЯМР конфор-

Рис. 2. Структурно-динамические данные ЯМР для APPjmtm. *а* – Межпротонные контакты ЯЭО, наблюдаемые между остатками APPjmtm в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC и $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC, накопленных со временем смешивания $t_m = 80$ мс. *б* – Доступность амидных групп APPjmtm водному окружению мицеллы. *Сверху* представлены данные о временах полуобмена, $t_{1/2}$, амидных протонов остатков APPjmtm на дейтерий растворителя. Закрашенными кругами показаны остатки с $t_{1/2} > 2$ ч, пустыми – с $1 \leq t_{1/2} \leq 2$ ч; для остальных остатков $t_{1/2} < 1$ ч. *Снизу* квадратами обозначены остатки APPjmtm, сигналы амидных протонов которых претерпевают изменения химического сдвига более 3×10^{-3} м.д. при изменении температуры на 1°C , что указывает на доступность данных протонов растворителю. *в* – Приведено отличие значений химических сдвигов сигналов ядер $^{13}\text{C}\alpha$ и $^1\text{H}^{\text{N}}$ APPjmtm от табличного значения в конформации «неупорядоченный клубок», так называемый вторичный химический сдвиг. Значение $\Delta\delta_{^{13}\text{C}\alpha}$ (показано *сверху*) зависит от типа вторичной структуры полипептидной цепи: положительное для спиральных участков, отрицательное для развернутой (в том числе β -структуры) конформации [18]. Значение $\Delta\delta_{^1\text{H}^{\text{N}}}$ (показаны *снизу*) помимо прочего сильно зависит от длины водородной связи, в которой участвует амидный протон, при этом локальное увеличение значения $\Delta\delta_{^1\text{H}^{\text{N}}}$ указывает на укорочение данной водородной связи [24]. *г* – Для амидных групп APPjmtm приведены ^{15}N -релаксационные параметры: *сверху*, значения гетероядерного $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ ЯЭО; *снизу*, значения эффективного времени корреляции броуновского вращения τ_R , рассчитанного из отношения $^{15}\text{N} T_1/T_2$. *д* – Уширение сигналов амидных групп APPjmtm в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC после добавления 5- и 16-ДСК (в соотношении одна спиновая метка на мицеллу), имеющих тенденцию преимущественно распределяться вблизи поверхности и центра мицеллы соответственно. *е* – Изменение обобщенного химического сдвига $\Delta\delta_{[^1\text{H}^{\text{N}]}}$ кросс-пиков от амидных групп APPjmtm в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC при добавлении одной молекулы холестерилгемисукцината на мицеллу ДФХ. *ж* – Распределение значений углов φ , ψ и χ^1 основной и боковой цепей остатков по репрезентативному набору из 20 ЯМР-структур APPjmtm. Под аминокислотной последовательностью APPjmtm стрелками указаны места расщепления APP α - и γ -секретазы, а также аминокислотные мутации, обнаруженные при наследственных формах болезни Альцгеймера [8, 10].



мационного обмена и содержание белковых примесей не более 5%. Для последовательного отнесения ^1H -, ^{13}C - и ^{15}N -резонансов APPjmtm и получения структурно-динамической информации был накоплен стандартный набор из двух- и трехмерных гетероядерных ЯМР-спектров (см. раздел «Экспериментальная часть»).

Из анализа совокупности полученных ЯМР-данных следует, что пептид APPjmtm содержит два структурированных спиральных участка. Здесь наблюдаются характерные для спиралей i -, $i+3$ -контакты ЯЭО (рис. 2а) и положительные вторичные химические сдвиги сигналов $^{13}\text{C}\alpha$ (рис. 2в), а также небольшие значения температурных коэффициентов химических сдвигов сигналов $^1\text{H}^{\text{N}}$ (рис. 2б). В спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC и $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC кросс-пики ЯЭО между протонами аминокислотных остатков двух спиральных участков не обнаружены, что, по-видимому, свидетельствует об отсутствии межспиральных взаимодействий. В результате расчета пространственной структуры на основе экспериментальных данных, приведенных в таблице, установлено, что APPjmtm в мицеллахДФХ состоит из двух α -спиралей – Lys687–Asp694 и Gly700–Leu723 (рис. 3), соединенных неструктурированным петлевым участком Val695–Lys699. Относительная ориентация двух спиралей в полученном наборе структур APPjmtm не определена (рис. 3а). В то же время структура каждой α -спирали рассчитана с высокой точностью (таблица, рис. 2ж, 3а,б). Отметим также, что конформация основной цепи и боковых цепей точнее установлена для α -спирали Gly700–Leu723.

Для определения топологии α -спиралей APPjmtm в мицеллеДФХ проанализировано уширение сигналов протонов амидных групп пептида, вызванное их пространственной близостью к парамагнитным спиновым меткам 5- и 16-ДСК, преимущественно распределяющимся вблизи поверхности и центра мицеллы соответственно. На основании картины изменения интенсивности кросс-пиков в спектре $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC при добавлении спиновых меток (рис. 2д), а также данных о замедленном обмене протонов амидных групп на дейтерий растворителя (рис. 2б) сделан вывод о том, что α -спираль Lys687–Asp694 (далее JM-спираль) лежит в области гидратированных полярных группДФХ, а α -спираль Gly700–Leu723 (далее TM-спираль) пронизывает гидрофобную часть мицеллы. Амфифильность короткой JM-спирали также предполагает ее расположение вдоль поверхности мицеллы приблизительно перпендикулярно к TM-спирали, как показано на рис. 3г. Следующие друг за другом слабополярные и гидрофобные аминокислотные остатки на участке Gly700–Leu723 форми-

Структурная статистика для репрезентативного набора из 20 ЯМР-структур APPjmtm, встроенного в мицеллыДФХ

ЯМР-данные для расчета структуры	Статистика
Общее количество ограничений ЯЭО	318
Внутриостаточные	111
Межостаточные	207
последовательные ($ i-j =1$)	132
средней дальности ($1 < i-j \leq 4$)	75
дальние ($ i-j > 4$)	0
Ограничения на водородные связи (верхние/нижние) между атомами основной цепи (24 связи) между атомами основной и боковой цепей (0 связей)	72/72 0/0
Ограничения на двугранные углы	74
угол ϕ основной цепи	30
угол ψ основной цепи	30
угол χ^1 боковой цепи	14
Качество расчета и структурная статистика	
Штрафная функция программы CYANA (\AA^2)	0.38 ± 0.03
Нарушения ограничений	
на расстояния ($>0.2 \text{\AA}$)	1
на двугранные углы ($>5^\circ$)	0
Попарное среднеквадратическое отклонение между структурами (\AA)	
примембранная α -спираль, остатки Lys687–Asp694	
по атомам основной цепи	0.23 ± 0.09
по всем тяжелым атомам	1.59 ± 0.28
TM α -спираль, остатки Gly700–Leu723	
по атомам основной цепи	0.14 ± 0.05
по всем тяжелым атомам	0.55 ± 0.10
Анализ карты Рамачандрана (% остатков)	
в благоприятных регионах	84.6
в дополнительных разрешенных регионах	13.5*
в принципиально разрешенных регионах	1.5*
в запрещенных регионах	0.4*

*Остатки из подвижных и неструктурированных участков APPjmtm.

руют протяженный $\sim 40 \text{\AA}$ TM-сегмент. Положительно заряженные аминокислотные группы боковых цепей Lys699 и Lys724, фланкирующих TM-спираль, взаимодействуют, по-видимому, с отрицательно заряженными фосфатными группами головок детергента. Наблюдаемая $i+4$ -периодичность вторичного химического сдвига сигналов протонов $^1\text{H}^{\text{N}}$ (рис. 2в) указывает на периодическое изменение длин водородных связей $\text{H}^{\text{N}} \cdots \text{O}^{\text{C}}$ вдоль TM-спирали [24]. Амидные группы остатков Leu705, Gly709, Ala713 и Val715, располо-

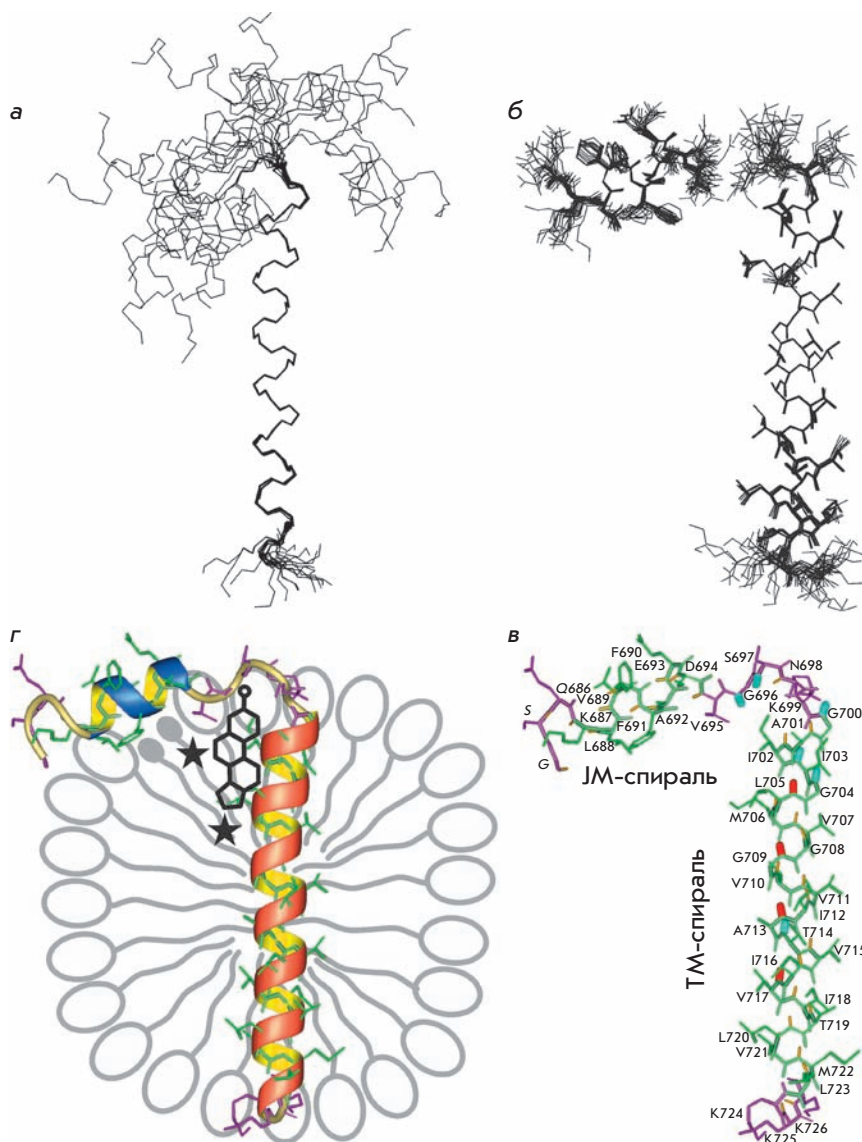


Рис. 3. Пространственная структура APPjmtm. **а** – Набор из 20 ЯМР-структур APPjmtm, совмещенных по атомам основной цепи α -спирали Gly700–Leu723. Показана только основная цепь пептида. **б** – Набор из 20 ЯМР-структур APPjmtm, совмещенных по атомам основных цепей α -спиралей Lys687–Asp694 (JM-спираль) и Gly700–Leu723 (TM-спираль) по отдельности. Из-за неопределенности в расположении α -спиралей относительно друг друга структуры APPjmtm приведены с разрывом в неструктурированном петлевом участке между остатками Gly696–Ser697. Показаны только тяжелые атомы. **в** – Репрезентативная пространственная структура APPjmtm с нумерацией остатков, соответствующей APP. Показаны ковалентные связи с участием тяжелых атомов (для α -спиралей зеленым цветом), а также амидных протонов (желтым). Красным выделены амидные группы остатков TM-спирали с максимальными локальными значениями вторичного химического сдвига $\Delta\delta_{\text{HN}} \approx 0$ (рис. 2в). Голубым выделены амидные группы остатков, показавшие изменение обобщенного химического сдвига $\Delta\delta_{\text{[HN]}} > 0.04$ (рис. 2е) при добавлении аналога холестерина к мицеллам со встроенным APPjmtm. **г** – Представлено схематичное изображение мицеллыДФХ со встроенным мономером APPjmtm, JM- и TM-спирали которого выделены синим и красным соответственно. Под JM-спиралью показано предполагаемое разрежение полярных головок детергента со встроенными спиновыми метками 5- и 16-ДСК, парамагнитные центры которых схематично показаны в виде звездочек, расположенных ближе к поверхности и к центру мицеллы соответственно. Под межспиральной петлей рядом с N-концом TM-спирали схематично указан холестеринсвязывающий центр TM-домена APP.

женные на одной стороне TM-спирали (рис. 3в), образуют более короткие водородные связи $\text{H}^{\text{N}} \cdots \text{O}^{\text{C}}$, чем остатки с противоположной стороны спирали. Таким образом, у TM-спирали в районе спаренных остатков Gly708–Gly709 имеется небольшая вогнутость со слабополярной поверхностью.

Наличие двух независимых спиральных участков в структуре APPjmtm подтверждается также ^{15}N -релаксационными данными. JM- и TM-спирали APPjmtm имеют разные характерные значения (~ 6

и ~ 9 нс соответственно) эффективного времени корреляции броуновского вращения τ_{R} , рассчитанного из отношения T_1/T_2 (рис. 2г). Оценка массы супрамолекулярного комплекса согласно эмпирической зависимости [25] из усредненного по спиральным участкам значения $\langle \tau_{\text{R}} \rangle \approx 8$ нс дает величину около 27 кДа, что соответствует мономеру APPjmtm, окруженному примерно 57 молекулами детергента (типичный состав мицеллыДФХ [26]). Значительная разница (~ 3 нс) в значениях $\langle \tau_{\text{R}} \rangle$ у остатков

JM- и ТМ-спиралей частично объясняется топологией APPjmtm с перпендикулярным относительным расположением α -спиралей в анизотропно вращающейся мицелле. Помимо этого, возможно вращение APPjmtm внутри мицеллы, а также повышенная латеральная подвижность JM-спирали (по сравнению с ТМ-сегментом) за счет подвижной соединительной петли Val695–Lys699. О подвижности петлевого участка в сравнении с α -спиралью свидетельствует локальное уменьшение для Ser697 значения эффективного времени корреляции броуновского вращения τ_r . В свою очередь, из распределения значений гетероядерного $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ ЯЭО (рис. 2г) следует, что, в отличие от жесткой ТМ-спирали ($^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ ЯЭО ≥ 0.8), N-концевая половина JM-спирали и соединительная петля Val695–Lys699 подвижны в пиконаносекундном диапазоне ($0.6 \leq ^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ ЯЭО ≤ 0.8). Повышенная подвижность приводит к тому, что конформация JM-спирали установлена менее точно (таблица, рис. 2ж и 3б), а структура петлевого участка не определена.

Полученные в настоящей работе структурно-динамические данные соответствуют результатам недавних ЯМР-исследований [13] вторичной структуры и динамики более длинного фрагмента APP – Asp672–Asn770, так называемого пептида С99, который является С-концевой частью APP после гидролиза β -секретазой. Определены границы спиральных участков Val689–Asp694 и Asn698–Lys724, пептида С99, соответствующих α -спиральям – короткой примембранной и длинной трансмембранной, соединенным подвижной перемычкой. Однако пространственная структура пептида С99 не была рассчитана. На основании данных о титровании пептида С99 в мицеллах LMPG водорастворимым аналогом холестерина, β -CHOLVIMALT, предположили, что APP может функционировать и как сенсор холестерина в мембране нейронов. Действительно известно, что в организме человека APP накапливается в богатых холестерином микродоменах, названных липидными рафтами [27, 28]. Более того, ферментативный гидролиз β -секретазой, ведущий к образованию β -амилоида, происходит, в первую очередь, в липидных рафтах [28]. Также установлено, что гидролиз по неамилоидогенному пути α -секретазой происходит вне холестерин-богатых кластеров, причем фермент инактивируется при связывании субстрата с липидными рафтами [28]. В настоящей работе изучено связывание APPjmtm со встраивающимся в мицеллу аналогом холестерина – холестерилгемисукцинатом. Наиболее значимые изменения обобщенного химического сдвига $\Delta\delta_{\text{[HN]}}$ наблюдаемые у остатков Gly695, Ser696, Gly700, Ile701, Ile703 и Thr713 (рис. 2е), указывают на место встраивания

холестерилгемисукцината в области межспиральной петли (рис. 3в,г), что хорошо согласуется с ранее полученными данными о специфическом взаимодействии пептида С99 с другим аналогом холестерина [13].

Данные по титрованию APPjmtm в мицеллах парамагнитными спиновыми метками (рис. 2д) косвенно подтверждают, что рядом с JM-спиралью и N-концом ТМ-спирали находится гидрофобная полость, предназначенная для взаимодействия APP с холестерином. При равномерном распределении спиновых меток 5- или 16-ДСК наблюдалось бы одинаковое уширение сигналов, находящихся на одном расстоянии от центра мицеллыДФХ. Однако в обоих случаях регистрируется различное уширение сигналов остатков, находящихся на разных концах трансмембранной α -спирали (рис. 2д). Причин у этого явления может быть несколько. Во-первых, распределение спиновых меток по мицелле может быть неоднородным в силу особой структуры и свойств встроенного в нее APPjmtm. Во-вторых, длина и размер боковых цепей, контактирующих с метками аминокислотных остатков, влияют на степень экранирования амидных протонов (что, видимо, наиболее выражено на участках Gly700–Leu705 и Ile718–Leu723). Вместе с тем значительное уширение сигналов на участке Leu688–Ala692 при титровании спиновой меткой 16-ДСК напрямую указывает на локальное изменение структуры мицеллы под поверхностной примембранной α -спиралью, которая, по-видимому, «расталкивает» полярные головкиДФХ (липидов), что приводит к образованию «гидрофобного кармана». В этот «карман» с некоторой избирательностью встраиваются обе спиновые метки (рис. 3г), имеющие небольшие полярные группы.

Модификация внешних условий и окружения APP в клеточной мембране может влиять на изменение конформации межспирального петлевого участка. Это должно привести к вариации взаимной ориентации JM- и ТМ-спиралей с изменением размера холестеринсвязывающего «гидрофобного кармана», что, в свою очередь, может играть роль в модулировании функции APP. Тандем из остатков Gly708–Gly709 в центре ТМ-спирали APP может служить неким компенсатором толщины липидного бислоя, которая изменяется в зависимости от состава клеточной мембраны, в том числе из-за холестерина, входящего в состав липидных рафтов. Важно отметить, что семейные мутации, ассоциированные с ранним развитием болезни Альцгеймера, сосредоточены не только рядом с ТМ-сайтами расщепления APP γ -секретазой, но и на С-конце JM-спирали, где расположены ионогенные остатки Asp693 и Glu694 (рис. 2, низ). Поэтому установлен-

ние в мембраноподобной среде методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии пространственной структуры ТМ-домена APP с холестеринсвязывающим примембранным участком является необходимым шагом в раскрытии молекулярного механизма альтернативного расщепления APP, ассоциированного с патогенезом болезни Альцгеймера. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, Федеральной целевой программой «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» и Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grigorenko A.P., Rogaev E.I. // Mol. Biol. (Mosk). 2007. V. 41. P. 331–345.
2. Duce J.A., Tsatsanis A., Cater M.A., James S.A., Robb E., Wikke K., Leong S.L., Perez K., Johanssen T., Greenough M.A., et al. // Cell. 2010. V. 142. P. 857–867.
3. Rauk A. // Dalton Trans. 2008. V. 14. P. 1273–1282.
4. Selkoe D.J. // Nature. 2003. V. 426. P. 900–904.
5. Steiner H., Fluhrer R., Haass C. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 29627–29631.
6. Soscia S.J., Kirby J.E., Washicosky K.J., Tucker S.M., Ingelsson M., Hyman B., Burton M.A., Goldstein L.E., Duong S., Tanzi R.E., Moir R.D. // PLoS One. 2010. V. 5. P. e9505.
7. Thinakaran G., Koo E.H. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 29615–29619.
8. Wiley J.C., Hudson M., Kanning K.C., Schecterson L.C., Bothwell M. // J. Neurochem. 2005. V. 94. P. 1189–1201.
9. Gorman P.M., Kim S., Guo M., Melnyk R.A., McLaurin J., Fraser P.E., Bowie J.U., Chakrabartty A. // BMC Neuroscience. 2008. V. 9. P. 17–27.
10. Munter L.M., Voigt P., Harmeier A., Kaden D., Gottschalk K.E., Weise C., Pipkorn R., Schaefer M., Langosch D., Multhaup G. // EMBO J. 2007. V. 26. P. 1702–1712.
11. Kienlen-Campard P., Tasiaux B., van Hees J., Li M., Huysseune S., Sato T., Fei J.Z., Aimoto S., Courttoy P.J., Smith S.O., et al. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 7733–7744.
12. Marenchino M., Williamson P.T., Murri S., Zandomenighi G., Wunderli-Allenspach H., Meier B.H., Krämer S.D. // Biophys. J. 2008. V. 95. P. 1460–1473.
13. Beel A.J., Mobley C.K., Kim H.J., Tian F., Hadziselimovic A., Jap B., Prestegard J.H., Sanders C.R. // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 9428–9446.
14. Curtain C.C., Ali F., Volitakis I., Cherny R.A., Norton R.S., Beyreuther K., Barrow C.J., Masters C.L., Bush A.I., Barnham K.J. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 20466–20473.
15. Bokvist M., Lindstrom F., Watts A., Grubner G. // J. Mol. Biol. 2004. V. 335. P. 1039–1049.
16. Бочарова О.В., Надеждин К.Д., Бочаров Э.В., Арсеньев А.С. // Биоорган. химия. 2010. Т. 36. № 1. С. 105–111.
17. Keller R.L.J. The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial, Goldau, Switzerland: CANTINA Verlag, 2004. 81 p.
18. Cavanagh J., Fairbrother W.J., Palmer A.G., Skelton N.J. Protein NMR spectroscopy: principles and practice. 2nd ed. San Diego, CA, USA: Acad. Press, 2007. 886 p.
19. Bocharov E.V., Korzhnev D.M., Blommers M.J., Arvinte T., Orekhov V.Y., Billeter M., Arseniev A.S. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 46273–46279.
20. Güntert P. // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 2003. V. 43. P. 105–125.
21. Cornilescu G., Delaglio F., Bax A. // J. Biomol. NMR. 1999. V. 13. P. 289–302.
22. Baker E.N., Hubbard R.E. // Prog. Biophys. Molec. Biol. 1984. V. 44. P. 97–179.
23. Koradi R., Billeter M., Wüthrich K.J. // Mol. Graphics. 1996. V. 14. P. 51–55.
24. Wagner G., Pardi A., Wüthrich K. // J. Am. Chem. Soc. 1983. V. 105. P. 5948–5949.
25. Daragan V.A., Mayo K.H. // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 1997. V. 31. P. 63–105.
26. Lazaridis T., Mallik B., Chen Y. // J. Phys. Chem. B. 2005. V. 109. P. 15098–15106.
27. Vetrivel K.S., Thinakaran G. // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1801. P. 860–867.
28. Beel A.J., Sakakura M., Barrett P.J., Sanders C.R. // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1801. P. 975–982.

УДК 571.27

Изучение способности лигандов рецептора NOD1 активировать транскрипционный фактор NF- κ B в условиях *in vitro* и *in vivo*

А. И. Тухватулин^{1*}, Д. Ю. Логунов¹, И. И. Гитлин², М. М. Шмаров¹, П. В. Кудан¹,
А. А. Аджиева¹, А. Ф. Мороз¹, Н. Н. Костюкова¹, Л. Г. Бурделя², Б. С. Народицкий¹,
А. Л. Гинцбург¹, А. В. Гудков²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

²Roswell Park Cancer Institute, Elm & Carlton Streets, Buffalo, New York, USA

*E-mail: amir_tuhvatulin@yahoo.com

Поступила в редакцию 31.01.2011 г.

РЕФЕРАТ Паттерн-распознающие рецепторы (pattern-recognition receptors (PRR)) выполняют важные функции в формировании реакций иммунной защиты организма против развивающейся бактериальной или вирусной инфекции. Распознавая специфические высококонсервативные последовательности в структуре патогенов, паттерн-распознающие рецепторы индуцируют развитие различных реакций как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Наряду с наиболее изученными Toll-подобными рецепторами в распознавании патогена принимают участие рецепторы, принадлежащие к другим семействам PRR, в том числе NOD-подобные рецепторы. Связывание собственных лигандов NOD-подобными рецепторами – NOD1 и NOD2, а также Toll-подобными рецепторами приводит к активации фактора транскрипции NF- κ B, регулирующего экспрессию различных генов, продукты которых участвуют в развитии различных провоспалительных реакций. В отличие от Toll-подобных рецепторов, NF- κ B-активирующая способность NOD-рецепторов на сегодняшний день описана в недостаточной степени.

Нами изучена способность одного представителя семейства NOD-подобных рецепторов – NOD1, активировать основной провоспалительный фактор транскрипции NF- κ B, а также проведена сравнительная характеристика способности лигандов NOD1-рецептора с различной структурой и лигандов Toll-подобных рецепторов 4 и 5 активировать NF- κ B в условиях *in vitro* и *in vivo*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА паттерн-распознающие рецепторы, Toll-подобные рецепторы, NOD1-рецептор, фактор транскрипции NF- κ B, пептидогликан грамотрицательных бактерий.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ NF- κ B – ядерный фактор κ B (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells); AP-1 – активирующий протеин-1 (activator protein 1); TLR – Toll-подобный рецептор (Toll-like receptor); PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns); DAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (damage-associated molecular patterns); PRR – паттерн-распознающие рецепторы (pattern-recognition receptors); TNF- α – фактор некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha); ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; IRF – интерферонрегулирующий фактор (interferon regulatory factor); NLR – NOD-подобные рецепторы (NOD-like-receptor); RLR – RIG-подобные рецепторы (RIG-I-like receptors); ЛПС – липополисахарид.

ВВЕДЕНИЕ

До недавнего времени механизмы распознавания инфекционных агентов клетками макроорганизма, а также молекулярные механизмы активации реакций врожденного и приобретенного иммунитета в ответ на развивающуюся инфекцию оставались малоизученными.

Важным шагом в понимании этих механизмов стало обнаружение около 20 лет назад первых представителей паттерн-распознающих рецепторов (PRR) врожденного иммунитета – Toll-подобных рецепторов (TLR) [1].

Сегодня известно семь семейств PRR: Toll-подобные рецепторы, NOD (nucleotide-oligomerization

domain)-подобные рецепторы (NLR), RIG-подобные рецепторы (RLR), рецепторы лектинового типа и др. [2]. Представители этих семейств способны узнавать специфичный для каждого из них набор высококонсервативных фрагментов экзогенных молекул, ассоциированных с патогенными микроорганизмами (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), а также некоторых эндогенных молекул, ассоциированных с повреждением собственных клеток макроорганизма (damage-associated molecular patterns, DAMP). Связывание собственных лигандов с паттерн-распознающими рецепторами приводит к запуску внутриклеточных сигнальных каскадов, вызывающих, в конечном итоге, активацию ряда факторов транскрипции (AP-1, NF- κ B, IRF 1, 3, 5, 7 и др.), регулирующих развитие тех или иных реакций иммунного ответа.

NF- κ B – основной провоспалительный фактор, регулирующий экспрессию ряда молекул, которые могут принимать участие в развитии реакций как врожденного, так и приобретенного иммунного ответа: секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов, синтезе антимикробных пептидов, индукции фагоцитозной активности макрофагов, созревании дендритных клеток и др. [3].

Одними из паттерн-распознающих рецепторов, активация которых приводит к индукции NF- κ B, являются Toll-подобные рецепторы, а также открытые сравнительно недавно представители подсемейства NOD-подобных рецепторов – NOD-рецепторы 1 и 2.

Toll-подобные рецепторы – это трансмембранные белки, локализованные на поверхности плазматической мембраны клеток, а также в составе внутриклеточных компартментов (эндосом). Лигандами Toll-подобных рецепторов могут служить молекулы различной химической природы и структуры, такие, как липополисахариды (ЛПС), флагеллин, бактериальные липопептиды, бактериальная и вирусная ДНК и другие. Получены многочисленные данные, характеризующие способность лигандов TLR активировать NF- κ B как *in vitro*, так и *in vivo* [4]. Опосредованная NF- κ B-способность лигандов TLR запускать различные реакции иммунной системы позволяет использовать лиганды в качестве средств немедленной защиты от патогенов, молекулярных адъювантов и т.д. [5–7].

Представители другого семейства PRR – NOD-рецепторы, располагаются непосредственно в цитоплазме клеток и распознают различные молекулы, представляющие собой фрагменты пептидогликана грамположительных и грамотрицательных бактерий. Показано, что NOD-рецепторы участвуют в распознавании бактерий, способных выходить из эндосомного пространства в цитоплазму клеток и запускать

ответные специфические иммунные реакции [8]. В отличие от лигандов TLR, свойства лигандов NOD-рецепторов, включая их способность активировать NF- κ B, изучены значительно меньше.

Цель представленной работы состояла в сравнительном анализе NF- κ B-активирующей способности лигандов одного представителя NOD-рецепторов – NOD1, и лигандов TLR 4 и 5 в условиях *in vitro* и *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии

NF- κ B-активирующую способность лигандов NOD1 и Toll-подобного рецептора 5 в условиях *in vitro* изучали с использованием клеточных линий HEK293 (эпителий эмбриональной почки человека), а также HCT116 (рак прямой кишки человека), экспрессирующих NOD1 человека. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 об.% фетальной бычьей сыворотки (кат. номер SV30160.03, Hyclone, США), 1 мг/мл глутамин (кат. номер. Ф032, ПанЭко, Россия), 50 Ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (кат. номер А065, ПанЭко, Россия) при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки рассевали в отношении 1 : 6 на вторые сутки при достижении монослоя.

Лиганды NOD1 и Toll-подобных рецепторов

Химически синтезированные лиганды NOD1, представленные препаратами дипептида D-Glu-mDAP (iE-DAP), трипептида L-Ala-D-Glu-L-mDAP (Tri-DAP), трипептида, ковалентно связанного с моносахаридом MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-mDAP (M-Tri-DAP), а также молекула, содержащая, помимо минимальной распознающей последовательности, фрагмент лауриловой кислоты Lauroyl- γ -D-Glu-D-mDAP (iE-DAP-C12), приобретены у фирмы Invivo-gen, США (кат. номера: tlrl-dap, tlrl-tdap, tlrl-c12dap). Лиганд TLR4 – ЛПС – приобретен в Sigma-Aldrich, США (кат. номер L3024). Лиганд TLR5 – флагеллин, получен как описано в работе [9]

Выделение и очистка молекулы GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-mDAP – фрагмента пептидогликана *Neisseria meningitidis* серогруппы В – лиганда NOD1-рецептора

Первичное культивирование *N. meningitidis* (штамм 591 дикого типа, принадлежащий к серогруппе В, выделен в 1985 г. в Москве из спинномозговой жидкости больного менингитом. Фенотип: В : NT : P1.1,2) проводили при 37°C в присутствии 5% CO₂ на среде Thayer Martin (кат. номер M413, Himedia, Индия). Для придания селективных свойств в среду добавляли набор

антибиотиков V.C.N.T. Supplement (кат. номер FD024, Himedia, Индия) Препаративное наращивание бактерии проводили в бульоне Brain Heart Infusion (кат. номер 211059, Difco, США) при добавлении 10 об.% сыворотки лошади при 37°C в условиях шутелирования (160 качаний/мин).

Выделение и хроматографическую очистку лиганда NOD1-рецептора проводили по ранее опубликованному методу [10], включающему предварительную термическую инактивацию бактерий при 65°C в течение 1 ч, фенол-хлороформную экстракцию при нагревании и перемешивании фенол-водной смеси при 70°C в течение 30 мин. Водную фазу, содержащую фрагменты пептидогликана, подвергали тангенсальной ультрафильтрации (Millipore, США) через фильтр с диаметром пор 30 кДа. Фильтрат очищали тремя последовательными методами обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Bioalliance 2796 (Waters, США). Первые два этапа очистки были выполнены с использованием колонки Symmetry C18 Column, диаметр частиц 5 мкм, 4.6 × 75 мм (Waters, США). На заключительном этапе очистки использовали колонку Synergi Hügro-RP 80 Å, диаметр частиц 4 мкм, 250 × 3 мм (Phenomenex, США).

Хроматографическое разделение веществ проводили с помощью спектрофотометрического детектора 2487 (Waters, США, λ 205, 260 и 280 нм), на завершающем третьем этапе очистки в качестве детектора также использовали масс-спектрометр Q-STAR Elite с ионоспрейными источниками ионизации Turbo Spray и Nano Spray (Applied Biosystems/MDS SCIEX, США). Полученный образец, содержащий масс-спектрометрически чистое вещество, подвергали масс-спектрометрическому анализу с целью определения первичной структуры исследуемой молекулы. На первом этапе анализа определяли точную молекулярную массу вещества, равную 850.353 Да. Затем молекулы изучаемого вещества фрагментировали в ионоспрейном источнике ионизации для последующего определения последовательности аминокислот, входящих в состав молекулы, используя программное обеспечение Protein Pilot (Applied Biosystems, США). Небелковую часть молекулы идентифицировали методом псевдо-МС3 (изучение продуктов вторичной фрагментации ионов, полученных путем предварительного распада исходной анализируемой молекулы в источнике ионизации). Изучение путей распада основных фрагментов иона анализируемой молекулы позволило определить ее итоговую брутто-формулу.

Сравнительный анализ спектров фрагментации различных контрольных веществ (включая N-ацетилглюкозамин) и анализируемого вещества

в идентичных условиях позволил разрешить первичную структуру молекулы: GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-mDAP.

Полученные результаты подтверждали, проводя аналогичную работу на образцах культуральной бактериальной среды (отрицательный контроль), кроме того, после каждого хроматографического этапа очистки измеряли биологическую активность образца, содержащего изучаемое вещество, т.е. его способность активировать NF-κB в клетках по Toll-независимому механизму.

Измерение активности β-галактозидазы

Через 24 ч после добавления исследуемых препаратов к клеткам культуральную среду удаляли и добавляли лизирующий клетки буфер с субстратом для β-галактозидазы (1 mM MgCl₂; 0.25 M Трис-HCl, pH 7.4; 0.02% NP40; 2 г/л о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (кат. номер 102473, MP Biomedicals, США)). Уровень активности β-галактозидазы определяли спектрофотометрически (414 нм) по превращению субстрата – о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида – в окрашенный продукт о-нитрофенол.

Определение интенсивности биолюминесценции в клетках линий НСТ116 и НЕК293, содержащих репортерный ген люциферазы под экспрессионным контролем NF-κB-зависимого элемента

На предварительном этапе клетки линий НСТ116 и НЕК293 заражали лентивирусным вектором, содержащим репортерный ген люциферазы под экспрессионным контролем NF-κB-зависимого промотора. За один день до определения биолюминесценции клетки высевали на 96-луночный планшет с конфлюентностью 2 × 10⁴ на лунку. На следующий день к клеткам добавляли препараты лигандов PRR, еще через 8 ч – лизирующий буфер, содержащий люциферин Bright-Glo™ Luciferase Assay System (кат. номер E2620, Promega, США). Объем буфера (100 мкл) был равен объему культуральной среды. Уровень активности люциферазы определяли по интенсивности флуоресценции, используя прибор Wallac 1420 plate reader (Perkin Elmer, США).

Определение интенсивности биолюминесценции в образцах гомогенатов органов трансгенных мышей линии BalB/C

Трансгенным мышам BalB/C, содержащим ген люциферазы под контролем NF-κB-зависимого промотора, вводили внутримышечно лиганды PRR (ЛПС или iE-DAP-C12), и через 1, 3 и 5 ч после этого производили забор органов. Органы гомогенизировали в лизирующем буфере Reporter Lysis 5x Buffer (кат. номер E3971, Promega, США) при добавлении ин-

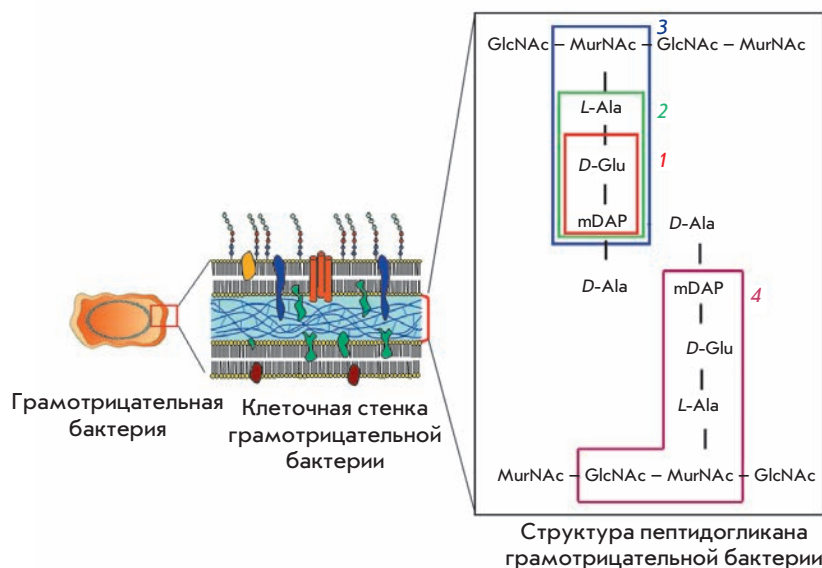


Рис. 1. Лиганды NOD1-рецептора в структуре пептидогликана грамотрицательных бактерий. 1 – *D*-Glu-mDAP (iE-DAP); 2 – *L*-Ala-*D*-Glu-*L*-mDAP (Tri-DAP); 3 – MurNAc-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-mDAP (M-Tri-DAP); 4 – GlcNAc-MurNAc-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-mDAP (GM-Tri-DAP). GlcNAc – N-ацетилглюкозамин; MurNAc – N-ацетилмурамовая кислота; *L*-Ala – *L*-аланин, *D*-Glu – *D*-глутаминовая кислота; mDAP – *L*-мезо-диаминопимелиновая кислота.

гибиторов клеточных протеаз. Уровень активности фактора транскрипции NF-κB в образцах гомогенатов органов мышей определяли по интенсивности биолюминесценции в нормированных по содержанию белка пробах (10 мг), используя прибор Wallac 1420 plate reader (Perkin Elmer, США).

Определение экспрессии NOD1-рецептора методом ОТ-ПЦР

Суммарную РНК из клеток линий НСТ116 и НЕК293 выделяли с использованием реагента Trizol (кат. номер 15596026, Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Для синтеза кДНК использовали набор Superscript III (кат. номер 18080200, Invivogen США). Количество кДНК, кодирующей NOD1-рецептор, нормировали по количеству кДНК *GAPDH*. Выполняли 35 циклов ПЦР с использованием праймеров, специфичных к нуклеотидной последовательности кДНК, кодирующей NOD1 человека – NOD1-forw: ctt-ctg-gtc-act-cac-atc-cgc-a, NOD1-rev: tgg-gca-tag-cac-agc-acg-aac. Температура отжига праймеров 62°C.

Измерение интенсивности биолюминесценции в организме трансгенных мышей BalB/C в режиме реального времени

Активность фактора NF-κB в организме трансгенных мышей BalB/C, содержащих в своем геноме репортерный ген люциферазы под экспрессионным контролем NF-κB-зависимого промотора, измеряли в режиме реального времени по интенсивности биолюминесценции через 1, 3, 5 ч после введения лигандов PRR (ЛПС или iE-DAP-C12). За 5 мин перед не-

посредственным получением изображений мышам вводили по 1.5 мг *D*-люциферина (Caliper Life Sciences). Интенсивность биолюминесценции определяли на приборе IVIS Imaging System 100 (Xenogen Corp., США)

Лабораторные животные

В эксперименте использовали самок трансгенных мышей линии BALB/c-Tg(NFκB-RE-luc[Oslo])-Xen (Caliper Life Sciences, США) весом 18–20 г, содержащих в геноме репортерный ген люциферазы светлячка (из pGL3-Basic Vector, Promega, США) под экспрессионным контролем NF-κB-зависимого промотора, состоящего из трех NF-κB-связывающих участков в промоторе гена легкой цепи Igκ.

Мыши имели свободный доступ к корму и воде. Мышам внутримышечно вводили растворы ЛПС (5 мкг/мышь), а также iE-DAP-C12 (200 мкг/мышь).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение NF-κB-активирующей способности лигандов NOD1-рецептора в условиях *in vitro*

Известно, что при разрушении грамотрицательных бактерий и попадании фрагментов пептидогликана внутрь эукариотических клеток ключевой последовательностью, необходимой и достаточной для активации NOD1-рецептора, является дипептид *D*-Glu-mDAP [10]. Участие других аминокислот и моносахаридов, входящих в состав структурных молекул пептидогликана грамотрицательных бактерий, в распознавании NOD1-рецептором остается не до конца выясненным (рис. 1).

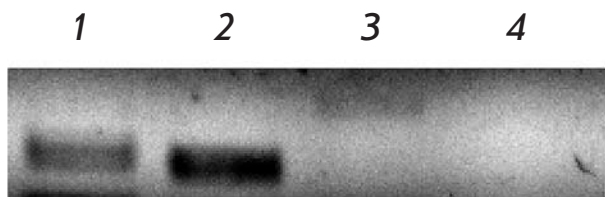


Рис. 2. Определение экспрессии рецептора NOD1 методом ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров в линии клеток рака прямой кишки человека НСТ116 (1); клетках эпителия эмбриональной почки человека HEK293 (2); клетках немелкоклеточного рака легкого человека H1299 (3); клетках рака легкого человека A549 (4).

В связи с этим представляется важным изучить зависимость NOD1-опосредованной NF-κB-активирующей способности различных фрагментов пептидогликана от их структуры.

С этой целью на предварительном этапе работы для выбора клеточной модели провели скрининговый эксперимент по определению экспрессии NOD1-рецептора различными клеточными линиями. По данным ОТ-ПЦР экспрессия NOD1-рецептора обнаружена в клетках линии HEK293 (эпителий эмбриональной почки человека), а также в клетках рака прямой кишки человека НСТ116. В этой клеточной линии экспрессируется также TLR5 [11], тогда как в клеточных линиях H1299 и A549 экспрессия NOD1-рецептора при выбранных условиях ОТ-ПЦР не детектировалась (рис. 2).

Ввиду того, что клетки линии HEK293 не экспрессируют TLR (присутствие которых может привести к дополнительной активации NF-κB при использовании лигандов NOD1-рецептора, содержащих примеси молекул-лигандов TLR), эта клеточная линия служила моделью для изучения способности лигандов NOD1-рецептора, имеющих различную структуру, активировать NF-κB.

Используя лентивирусный вектор, в геном клеток HEK293 ввели ген репортерного белка β-галактозидазы под транскрипционным контролем NF-κB-зависимого промотора, а также маркер устойчивости к бластицидину S. Принцип использования полученной клеточной линии основан на способности NOD1-рецептора, после взаимодействия его со специфическими лигандами, активировать каскад киназ (RIP2, IKKα,β), в результате чего происходит активация фактора NF-κB с последующей транслокацией его в ядро, где этот фактор связывается с собственным регуляторным элементом, под контролем которого находится ген галактозидазы. Таким обра-

зом, по цветной реакции на галактозидазу можно количественно измерить активность NF-κB в клетках, зарегистрировав взаимодействие NOD1-рецептора с собственными лигандами.

Для измерения активности NF-κB в клетках линии HEK293 добавляли различные по структуре лиганды NOD1-рецептора: дипептид *D*-Glu-mDAP (iE-DAP), трипептид *L*-Ala-*D*-Glu-*L*-mDAP (Tri-DAP), а также трипептид, ковалентно связанный с моносахаридом MurNAc-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-mDAP (M-Tri-DAP). Кроме того, в нашей работе использовался трипептид, ковалентно связанный с дисахаридом GlcNAc-MurNAc-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-mDAP (GM-Tri-DAP), полученный из *N. meningitidis* серогруппы В и очищенный до масс-спектрометрической чистоты по ранее описанному методу [10]. Дополнительно использовали химически синтезированную молекулу, содержащую не только минимальную распознающую последовательность, но и фрагмент лауриловой кислоты Lauroyl-γ-*D*-Glu-*D*-mDAP (iE-DAP-C12), меняющий физико-химические свойства данной молекулы.

Как видно из рис. 3, достоверное повышение NF-κB-зависимой активации экспрессии гена β-галактозидазы достигалось лишь при максимальных концентрациях (1–10 мкг/мл) добавляемого дипептида *D*-Glu-mDAP, тогда как производные этого дипептида с большей молекулярной массой, Tri-DAP, M-Tri-DAP и GM-Tri-DAP, встречающиеся в составе пептидогликана грамотрицательных бактерий, вызывали достоверное увеличение NF-κB-зависимой экспрессии гена β-галактозидазы при более низких концентрациях (от 0.5 мкг/мл). Наибольшую NOD1-опосредованную способность активировать NF-κB показала химически синтезированная молекула iE-DAP-C12. Минимальная концентрация данной молекулы, способная вызывать NF-κB-зависимую активацию экспрессии гена β-галактозидазы, равна 20 нг/мл. Такое значительное по сравнению с *D*-Glu-mDAP (около 1000 раз) увеличение NF-κB-активирующей способности можно объяснить присутствием гидрофобной части лауриновой кислоты, которая, по всей видимости, позволяет молекуле iE-DAP-C12 легче проникать через плазматическую мембрану и связываться с NOD1-рецептором, расположенным в цитоплазме клетки.

Таким образом, в ходе данного эксперимента было показано, что увеличение аминокислотной последовательности в структуре лиганда NOD1-рецептора приводит к достоверному увеличению NF-κB-активирующей способности молекулы по сравнению с минимальной последовательностью *D*-Glu-mDAP, активирующей NF-κB, тогда как присутствие остатков моносахаров в составе молекулы лиганда не влияет на дальнейшее увеличение активности.

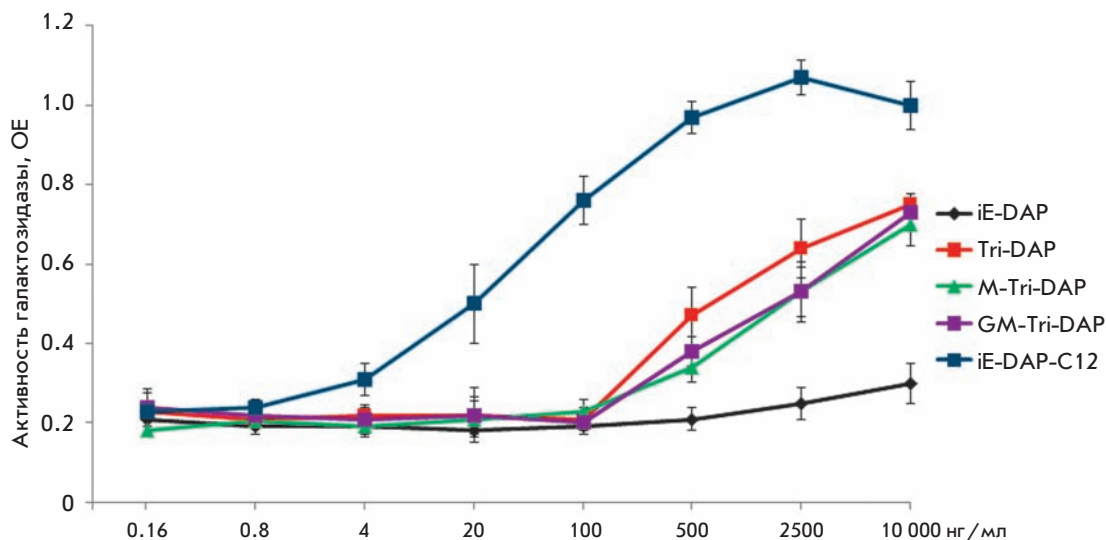


Рис. 3. Измерение активности фактора транскрипции NF-kB в клетках HEK293, экспрессирующих рецептор NOD1. Уровень активности β-галактозидазы определяли спектрофотометрически (λ = 414 нм) по превращению специфического субстрата о-нитрофенил-β-D-галактопиранозиды. По оси абсцисс – концентрация лигандов NOD1-рецептора.

Этот факт можно объяснить тем, что для максимально эффективного распознавания NOD1-рецептором (попадания в «карман» его лиганд-распознающего домена) молекула лиганда должна содержать как минимум три ковалентно связанные аминокислоты, тогда как дополнительно введенные молекулы моносахаридов не участвуют в непосредственном создании лиганд-рецепторного комплекса. Кроме того, NF-kB-активирующая способность лиганда NOD1-рецептора может быть значительно увеличена (примерно в 1000 раз) за счет повышения гидрофобности молекулы в результате присоединения к ней остатка жирной кислоты. Такая модификация, скорее всего, позволяет быстрее обеспечить необходимую концентрацию лиганда вблизи рецептора в цитоплазме за счет облегчения прохождения его через плазматическую мембрану клетки.

Лиганд NOD1-рецептора iE-DAP-C12, показавший наибольшую активность, был выбран для дальнейших исследований.

Сравнение NF-kB-активирующей способности лигандов NOD1 и TLR5 в клетках рака прямой кишки человека HCT116

Для сравнения NF-kB-активирующей способности лигандов NOD и TLR в условиях *in vitro* в качестве модели выбрали клеточную линию HCT116, экспрессирующую как NOD1-рецептор, так и TLR5, лигандом которого служит белок жгутиков бактерий – флагеллин.

Активность NF-kB измеряли по экспрессии гена люциферазы, введенного в геном клеток под транскрипционным контролем NF-kB-зависимого элемента.

В качестве положительного контроля активации NF-kB использовали TNF-α. Этот цитокин после вза-

имодействия с собственным рецептором стимулирует активацию NF-kB и индуцирует экспрессию провоспалительных факторов.

Результаты опыта показывают (рис. 4), что наиболее активный из лигандов NOD1-рецептора – iE-DAP-C12 – оказывает на NF-kB эффект, сравнимый с эффектом флагеллина, но в концентрациях в 10–100 раз больших, чем флагеллин. По результатам этого опыта можно сделать вывод, что лиганды NOD1-рецептора слабее активируют NF-kB, чем лиганд TLR5, по крайней мере, при использованном пути доставки. Подобный феномен можно объяснить целым рядом причин: необходимостью прохождения лигандами NOD1-рецептора дополнительных барьеров (плазматической мембраны и цитоплазматического пространства), разным сродством TLR и NOD-рецепторов к собственным лигандам, различиями в нижележащих сигнальных каскадах, приводящих к активации фактора транскрипции NF-kB.

Способность лигандов NOD1-рецептора вызывать специфические реакции иммунного ответа при более слабой активации NF-kB в эукариотических клетках, чем TLR, может свидетельствовать о том, что уровень активности NF-kB может определять развитие тех или иных специфических реакций иммунного ответа, а также регулировать их интенсивность.

Установленное соотношение концентрации лигандов NOD1 и TLR, активирующих NF-kB, в равной степени было учтено при проведении последующих исследований в условиях *in vivo*.

Изучение NF-kB-активирующей способности лиганда NOD1-рецептора в условиях *in vivo*

Ранее было показано, что уровень активации NF-kB может отличаться в разных органах лабораторных

Рис. 4. Измерение уровня активности фактора транскрипции NF-kB в клетках НСТ116, одновременно экспрессирующих рецепторы NOD1 и TLR5.

■ – клетки, обработанные лигандом Toll-подобного рецептора 5 – флагеллином; ■ – клетки, обработанные лигандом NOD1-рецептора – iE-DAP-C12; ■ – контрольные интактные клетки; ■ – клетки, обработанные TNF-α в концентрации 10 нг/мл. Уровень активности люциферазы определяли спектрофотометрически после добавления специфического субстрата люциферина. По оси абсцисс – концентрация лигандов NOD1- и TLR5-рецепторов.

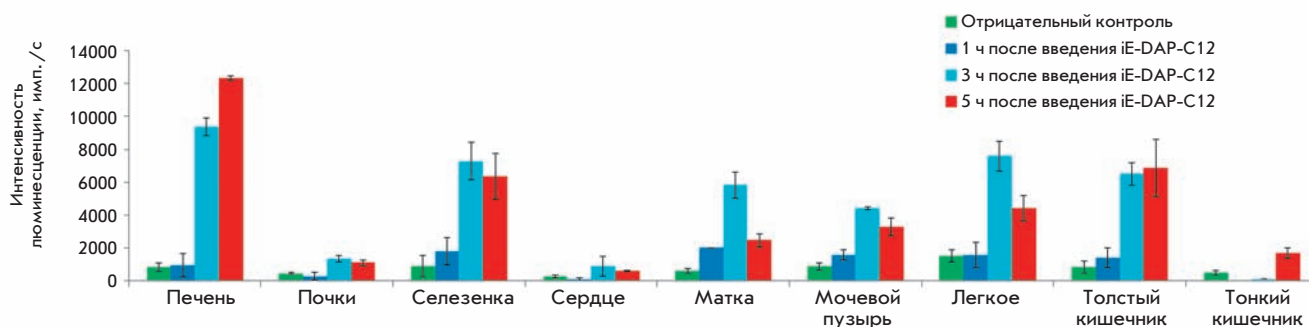
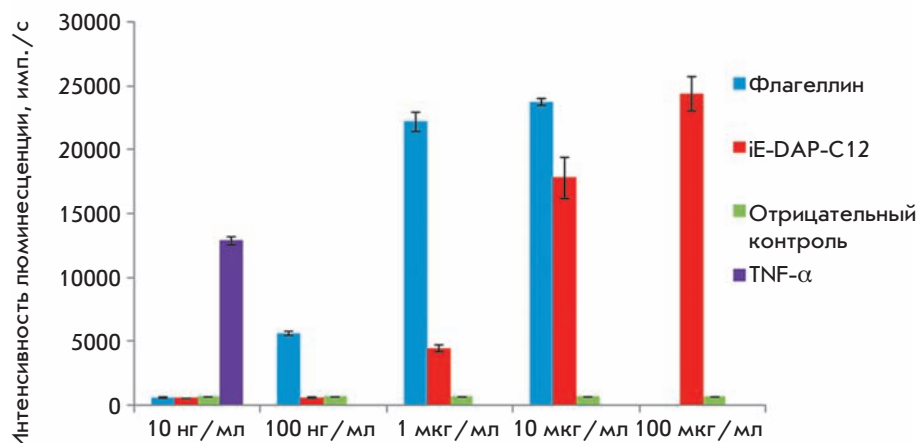


Рис. 5. Измерение уровня активности фактора транскрипции NF-kB в образцах гомогенатов органов мышей через 1, 3, 5 ч после введения лиганда NOD1-рецептора – iE-DAP-C12. Образцы гомогенатов органов были нормированы по содержанию общего белка (10 мг/мл). ■ – активность NF-kB в органах контрольных мышей через 3 ч после введения 100 мкл фосфатного буфера. ■ – активность NF-kB в органах мышей через 1 ч после введения iE-DAP-C12 (200 мкг/мышь). ■ – активность NF-kB в органах мышей через 3 ч после введения iE-DAP-C12 (200 мкг/мышь). ■ – активность NF-kB в органах мышей через 5 ч после введения iE-DAP-C12 (200 мкг/мышь). Уровень активности люциферазы определяли спектрофотометрически после добавления специфического субстрата люциферина.

животных, которым ввели лиганды TLR [12, 13]. Однако на сегодняшний день отсутствуют данные, показывающие способность лигандов других PRR – NOD-рецепторов, вызывать активацию NF-kB в условиях *in vivo*. Мы изучили этот вопрос, определив основные параметры активации (кинетику и интенсивность активации в различных органах) при введении лиганда NOD1-рецептора iE-DAP-C12, показавшего наибольшую активность в опытах *in vitro*. Кроме того, мы сравнили NF-kB-активирующие способности лигандов NOD и TLR4, наиболее полно изученного Toll-подобного рецептора, в условиях *in vivo* при внутримышечном введении.

С этой целью мы использовали трансгенных мышей линии BalB/C, в геном которых встроен репортерный ген люциферазы под контролем NF-kB-

зависимого промотора. Такая система позволяет измерять степень активации NF-kB в различных органах мышей по интенсивности люминесцентного свечения при введении лигандов PRR [14].

Для сравнения параметров активации NF-kB, наблюдаемой при введении iE-DAP-C12, мы выбрали наиболее изученный в условиях *in vivo* лиганд Toll-подобного рецептора 4 – ЛПС [13, 15, 16].

Количества лигандов NOD1 и TLR4 выбирали, исходя из данных о NF-kB-активирующей способности этих лигандов в условиях *in vitro* (200 мкг/мышь и 5 мкг/мышь соответственно).

Показано (рис. 5), что при внутримышечном введении iE-DAP-C12 наибольшая не только относительная, но и абсолютная индукция активации NF-kB (более 12 раз) наблюдается в печени. Кроме того,

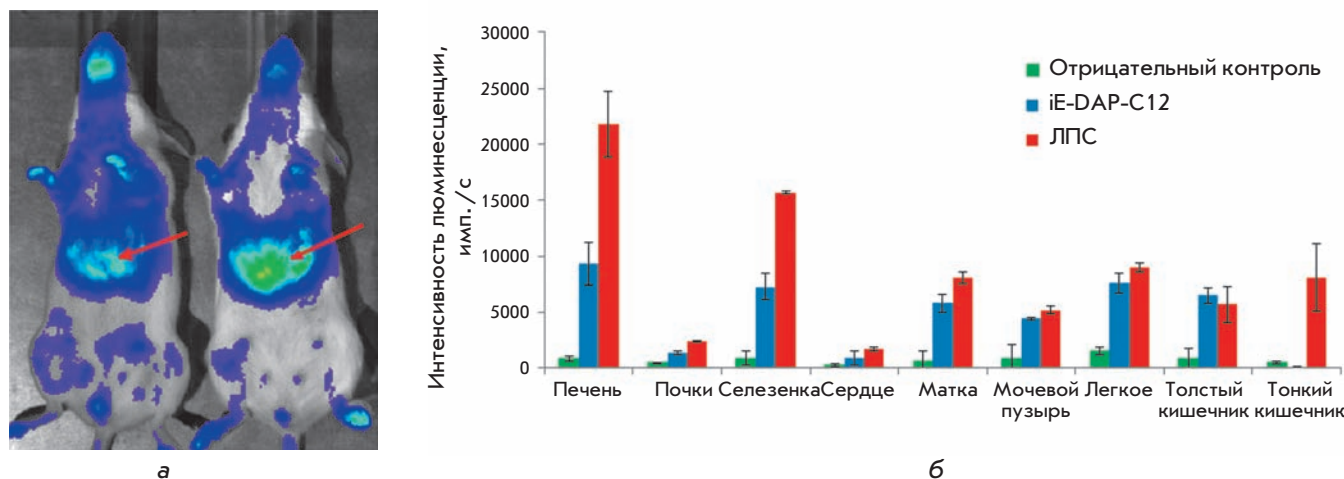


Рис. 6. Измерение уровня активности фактора транскрипции NF-kB в организме мышей после введения лиганда NOD1-рецептора – iE-DAP-C12 (слева) и лиганда Toll-подобного рецептора 4 – липополисахарида (ЛПС) *E. coli* (справа) в режиме реального времени (а) и в образцах гомогенатов органов мышей через 3 ч после введения iE-DAP-C12 и ЛПС *E. coli* (б). Красными стрелками указана наибольшая интенсивность биолуминесценции, локализованная в печени мышей после введения лигандов PRR. Образцы гомогенатов органов были нормированы по содержанию общего белка (10 мг/мл). ■ – активность NF-kB в органах контрольных мышей через 3 ч после введения 100 мкл фосфатного буфера. ■ – активность NF-kB в органах мышей через 3 ч после введения iE-DAP-C12 (200 мкг/мышь). ■ – активность NF-kB в органах мышей через 3 ч после введения ЛПС *E. coli* (5 мкг/мышь). Уровень активности люциферазы определяли спектрофотометрически после добавления специфического субстрата люциферина.

в печени и тонком кишечнике максимальный уровень активации NF-kB достигается через 5 ч после введения лиганда, тогда как в других органах в этот момент времени наблюдалось снижение уровня активации NF-kB. В трех из 9 органов лабораторных животных (почки, сердце, тонком кишечнике) введение лиганда NOD1 приводило к минимальному увеличению активации NF-kB по сравнению с уровнем активности NF-kB в контрольной группе.

На завершающем этапе мы сравнили уровни активации NF-kB в различных органах мышей, которым внутримышечно ввели iE-DAP-C12 и ЛПС через 3 ч после лигандов (в точке максимальной активации NF-kB).

Как видно из рис. 6а,б, введение ЛПС сильнее активирует NF-kB в ряде органов (печень, селезенка, матка, тонкий кишечник), чем iE-DAP-C12. В толстом кишечнике, легких и мочевом пузыре введение лигандов NOD1 и TLR4 вызывало сравнимые уровни активации NF-kB. В остальных органах (почках и сердце) не наблюдалось достоверного повышения уровня активации NF-kB в ответ на введение как iE-DAP-C12, так и ЛПС.

Таким образом, по результатам изучения способности лигандов NOD1 активировать NF-kB в условиях *in vivo* можно заключить, что интенсивность, а также кинетика активации NF-kB в ответ на введение

этих лигандов различаются в отдельных органах мышей. Кроме того, обнаружены различия в интенсивности активации NF-kB в органах мышей после введения лигандов NOD1 и TLR4 в выбранных концентрациях.

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что активация фактора NF-kB, вызванная взаимодействием NOD1-рецептора с собственными лигандами, отличается от активации при стимуляции представителей TLR (кинетика и интенсивность активации) в одном и том же органе, что может быть существенным для развития последующих реакций иммунного ответа. Кроме того, показанная ткане- и органоспецифичность активации NF-kB при введении лигандов Toll- или NOD-рецепторов в организм животного может приводить к развитию различных локальных реакций иммунного ответа в том или ином органе или ткани (например, могут наблюдаться различия в спектре секретируемых цитокинов). Развитие определенных иммунных реакций может объясняться различиями в дифференцировке, а также в типах клеток, представляющих ту или иную ткань, в которых произошла индукция активации NF-kB.

Способность лигандов NOD1-рецептора активировать фактор NF-kB в условиях *in vivo* может использоваться для создания новых молекулярных адъювантов, обладающих меньшей реактогенностью

по сравнению с некоторыми лигандами TLR (например, ЛПС). Такие адъюванты в перспективе могут применяться совместно с вакцинными антигенами для защиты от различных, в том числе внутрикле-

точных, патогенов. Для подтверждения этого предположения необходим детальный анализ отдельных иммунных реакций, инициируемых активацией NOD-рецепторов. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Medzhitov R., Janeway C. Jr. // *Trends Microbiol.* 2000. V. 10. P. 3452–3456.
2. Kishore U. *Target Pattern Recognition in Innate Immunity.* Springer Science +Business Media, LLC Landes Bioscience, 2009. 202 p.
3. Hayden M.S., West A.P., Ghosh S. // *Oncogene.* 2006. V. 51. P. 6758–6780.
4. Carmody R.J., Chen Y.H. // *Cell. Mol. Immunol.* 2007. V. 1. P. 31–41.
5. Gill N., Davies E.J., Ashkar A.A. // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008. V. 59. P. 35–43.
6. Borsutzky S., Kretschmer K., Becker P.D., Mühradt P.F., Kirschning C.J., Weiss S., Guzmán C.A. // *J. Immunol.* 2005. V. 174. P. 6308–6313.
7. Weeratna R.D., Makinen S.R., McCluskie M.J., Davis H.L. // *Vaccine.* 2005. V. 45. P. 5263–5270.
8. Warren S.E., Mao D.P., Rodriguez A.E., Miao E.A., Aderem A. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 7558–7564.
9. Burdelya L.G., Krivokrysenko V.I., Tallant T.C., Strom E., Gleiberman A.S., Gupta D., Kurnasov O.V., Fort F.L., Osterman A.L., Didonato J.A., et al. // *Science.* 2008. V. 5873. P. 226–230.
10. Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jéhanno M., Viala J., Tedin K., Taha M.K., Labigne A., Zähringer U., et al. // *Science.* 2003. V. 5625. P. 1584–1587.
11. Zhao L., Kwon M.J., Huang S., Lee J.Y., Fukase K., Inohara N., Hwang D.H. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 11618–11628.
12. Alexander G., Carlsen H., Blomhoff R. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003. V. 44. P. 2683–2688.
13. Carlsen H., Moskaug J.O., Fromm S.H., Blomhoff R. // *J. Immunol.* 2002. V. 168. P. 1441–1446.
14. Ho T.Y., Chen Y.S., Hsiang C.Y. // *Biomaterials.* 2007. V. 30. P. 4370–4377.
15. Austenaa L.M., Carlsen H., Hollung K., Blomhoff H.K., Blomhoff R. // *J. Nutr. Biochem.* 2009. V. 20. P. 726–734.
16. Pruett S.B., Fan R. // *BMC Immunol.* 2009. Doi 10.1186/1471-2172-10-49.

УДК 577.21

Семейный анализ сцепления и ассоциации полиморфизма генов *DRB1*, *CTLA4*, *TGFB1*, *IL4*, *CCR5*, *RANTES*, *MMP9* и *TIMP1* с рассеянным склерозом

О. Ю. Макарычева¹, Е. Ю. Царева^{1,2}, М. А. Судомоина^{1,2}, О. Г. Кулакова^{1,2}, Б. В. Титов^{1,2}, О. В. Быкова³, Н. В. Гольцова³, Л. М. Кузенкова³, А. Н. Бойко², О. О. Фаворова^{1,2*}

¹ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения и социального развития», 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

²ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», 117437, Москва, ул. Островитянова, 1

³Научный центр здоровья детей РАМН, 119991, Москва, Ломоносовский просп., 2/62

*E-mail: olga_favorova@mail.ru

Поступила в редакцию 14.02.2011 г.

РЕФЕРАТ В патогенезе рассеянного склероза (РС) – хронического воспалительного аутоиммунного заболевания центральной нервной системы (ЦНС) – важную роль играют белки иммунной системы, а также белки, участвующие в проникновении активированных клеток иммунной системы в ЦНС. Мы исследовали сцепление и ассоциацию с РС полиморфных участков следующих генов иммунной системы: *HLA-DRB1*, *CTLA4*, *TGFB1*, *IL4*, *CCR5* и *RANTES*, а также генов, кодирующих матриксную металлопротеиназу 9 (*MMP9*) и тканевый ингибитор металлопротеиназ 1 (*TIMP1*). Для анализа сцепления/ассоциации с РС полиморфных участков этих генов использовали тест неравновесной передачи аллелей (transmission disequilibrium test, TDT). В группе из членов 100 ядерных семей (больной РС и его здоровые родители), русских по этнической принадлежности, обнаружено, что аллели *HLA-DRB1*15* и *MMP9*(-1562)C* чаще передаются от здоровых родителей их больным детям, чем альтернативные аллели ($p = 0.02$ и 0.04 соответственно). Еще одним методом семейного анализа, АФВАС (affected family-based control), при сравнении распределения аллелей исследованных генов у больных РС и в контрольной группе, составленной из аллелей здоровых родителей, не переданных больным детям (по одному аллелю от каждого из родителей), подтверждена ассоциация с РС аллеля *HLA-DRB1*15*, но не *MMP9*(-1562)C*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА функциональная геномика, человек, рассеянный склероз, генотипирование, ген *CCR5*, ген *CTLA4*, ген *HLA-DRB1*, ген *IL4*, ген *RANTES*, ген *TGFB1*, ген *MMP9*, ген *TIMP1*, аллельный полиморфизм, TDT, АФВАС.

СОКРАЩЕНИЯ РС – рассеянный склероз; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ЦНС – центральная нервная система; АФВАС (affected family-based control) – метод семейного анализа, в котором контрольная группа составлена из аллелей, не перенесенных от родителей больным детям; *CCR5* (*CCR5*) – рецептор 5 СС-хемокинов (его ген); *CTLA4* (*CTLA4*) – антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (его ген); *HLA-DRB* (*HLA-DRB1*) – β-цепь человеческого лейкоцитарного антигена DR (его ген 1); *IL-4* (*IL4*) – интерлейкин 4 (его ген); *MMP* (*MMP*) – матриксная металлопротеиназа (его ген); *RANTES* (*RANTES*) – хемокин, регулируемый при активации, экспрессируемый и секретлируемый нормальными Т-клетками (его ген); SNP (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм; TDT (transmission disequilibrium test) – тест неравновесной передачи аллелей; *TGFβ1* (*TGFB1*) – трансформирующий фактор роста β1 (его ген); *TIMP* (*TIMP*) – тканевый ингибитор матриксных металлопротеиназ (его ген).

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – тяжелое воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), которое, как правило, развивается в трудоспособном возрасте и приводит к инвалидизации. Этиология этого заболевания является комплексной, с вовлечением как генетических, так и внешних факторов [1]. Тип наследования РС характерен для полигенных заболеваний, развитие которых обусловлено совместным вкладом множества полиморфных генов [2]. Выявление генетических факторов риска РС может способствовать выяснению механизмов патогенеза заболевания и открыть новые возможности для его профилактики и лечения.

Хотя генетика РС активно изучается, проблема поиска генов, ассоциированных с РС, далека от своего разрешения. Это связано с природой заболевания, для которого характерны генетическая гетерогенность, особенно в различных этнических группах, и отсутствие «главного» гена. С другой стороны, поиск факторов риска РС затруднен в силу ограничений основных методов анализа. Так, анализ сцепления областей генома с РС оказался мало информативным методом вследствие его низкой чувствительности [3], а при анализе генетических ассоциаций с РС методом «случай–контроль» наблюдается низкая воспроизводимость результатов, связанная с этнической гетерогенностью рассматриваемых групп больных и здоровых, а также с влиянием факторов окружающей среды [4].

Методы семейного анализа ассоциаций позволяют исключить или уменьшить влияние этнической неоднородности сравниваемых групп больных и неродственных здоровых, а также, в определенной степени, и влияние факторов окружающей среды [5]. Один из таких методов – метод неравновесной передачи аллелей (*transmission disequilibrium test*, TDT) [6], в основе которого лежит анализ случаев передачи маркерного аллеля или гаплотипа от гетерозиготных родителей больным детям. Метод TDT уже использовали для анализа сцепления и ассоциации аллелей ряда генов-кандидатов с РС в разных этносах [7–10], в том числе и в русском (наши исследования [11, 12]). В последнее время этот метод стали применять не только для анализа вклада отдельных генов в развитие РС, но и в качестве инструмента при полном геномном поиске [13–15]. На семейном материале проводят также анализ ассоциаций методом AFBAC (*affected family-based control*), согласно которому контрольная группа составляется из набора аллелей здоровых родителей, не переданных больным потомкам (по одному аллелю от каждого из родителей) [16]. С помощью этого метода предрасположенность к РС анализировали в Италии [17, 18], Великобрита-

нии [19], Бельгии [20] и Франции [21]. Каждый из этих методов семейного анализа имеет свои достоинства и недостатки: AFBAC является более мощным методом, чем TDT, тогда как TDT позволяет полностью устранить эффекты стратификации популяции [22].

В настоящей работе на семейном материале методами TDT и AFBAC проведен анализ сцепления и ассоциации с РС генов *HLA-DRB1*, *CTLA4*, *TGFB1*, *IL4*, *CCR5*, *RANTES*, *MMP9* и *TIMP1* у этнических русских.

Многочисленные данные свидетельствуют об участии этих генов в иммунопатогенезе РС как аутоиммунного заболевания [2]. Наиболее доказано вовлечение в развитие РС тех или иных (в зависимости от этнической принадлежности популяции) аллелей гена *HLA-DRB1* класса II, который кодирует β -цепь гетеродимера, представляющего антиген CD4 Т-лимфоцитам. Также в нашу работу включен ген *CTLA4*, кодирующий антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (*CTLA4*, или CD152) – костимулирующий рецептор Т-лимфоцитов, важный негативный регулятор активности Т-клеток, который участвует в поддержании периферической Т-клеточной толерантности [23].

В развитии и регуляции характерного для РС аутоиммунного воспалительного процесса ведущую роль отводят цитокинам. В дополнение к результатам, полученным нами при анализе сцепления и ассоциации с РС аллелей генов провоспалительных цитокинов [12], в настоящей работе рассмотрены гены двух противовоспалительных цитокинов: *TGF β 1* и *IL-4*. Цитокин *TGF β 1* секретируется многими типами клеток, включая регуляторные Т-лимфоциты, астроциты, эндотелиальные клетки, а *IL-4* – в основном активированными Th2-клетками. Эти цитокины выявляются в тканях головного мозга на стадии ремиссии, а при активном прогрессирующем РС их уровень снижен [24].

Ключевым этапом развития иммунопатологического процесса при РС является нарушение гематоэнцефалического барьера и проникновение Т- и В-клеток в ЦНС. Стимуляция и направление миграции клеток различных классов во многом определяются хемокинами. В наше исследование включены гены хемокина *RANTES* (*Regulated on Activation Normal T cells Expressed and Secreted*), хемоаттрактанта для лимфоцитов и моноцитов, и его рецептора *CCR5*. Уровни *RANTES* и *CCR5* резко повышаются на лимфоцитах, макрофагах и микроглии в очагах демиелинизации при обострении РС [25].

Проникновение иммунных клеток в ЦНС сопровождается разрушением коллагена типа IV, служащего основой внеклеточного матрикса. В преодолении этого барьера ключевую роль играют матриксные ме-

таллопротеиназы (ММР). ММР вовлечены в различные этапы патогенеза РС: они участвуют в локальном повреждении гематоэнцефалического барьера и периваскулярной лимфоцитарной инфильтрации, в разрушении миелиновой оболочки, формировании очагов демиелинизации и в гибели аксонов [26]. Одна из основных металлопротеиназ, ММР9, экспрессируется периваскулярными мононуклеарными клетками белого вещества и вместе с другими ММР ассоциирована с моноцитами и астроцитами в очагах демиелинизации. Активность ММР контролируется тканевыми ингибиторами матриксных металлопротеиназ (ТИМР), а в спинномозговой жидкости больных РС выявлено уменьшение содержания ТИМР1 [26]. Учитывая эти данные, в нашу работу включены гены *MMP9* и *TIMP1*.

У русских больных РС и их здоровых родителей мы провели геномное типирование 18 групп аллелей гена *HLA-DRB1*, однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) 49A>G гена *CTLA4*, -509C>T гена *TGFB1*, -590C>T гена *IL4*, -403G>A гена *RANTES*, -1562C>T гена *MMP9*, 372C>T гена *TIMP1*, а также делеционно-инсерционного полиморфизма *CCR5* (w>d) («дикий тип» → делеция 32 п.н.) с последующим анализом генетической предрасположенности к РС методами TDT и AFBAC. При выборе полиморфных участков для анализа исходили из данных об их связи с уровнем и/или активностью кодируемых белков. Так, хорошо известны функциональная роль аллелей гена *DRB1* в представлении антигенов и последствия делеции в гене *CCR5*, которая приводит к продукции неактивного белка *CCR5*. Что касается анализируемых SNP, то редкие аллели генов *TGFB1*, *IL4*, *RANTES* и *MMP9* ассоциированы с повышенным образованием белкового продукта [27–30] соответственно, а у носителей аллеля А гена *CTLA4* увеличена экспрессия кодируемого белка на поверхности клеток [31]. Исключение составляет SNP 372C>T гена *TIMP1*, данные о котором отсутствуют.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования

Использовали образцы периферической крови членов 104 ядерных семей, каждая из которых состояла из больного РС и его здоровых родителей. Образцы крови были собраны в Научном центре здоровья детей РАМН и в Московском городском центре рассеянного склероза. Диагноз РС поставлен согласно критериям Макдональда [32]; среди больных было 46 мужчин и 58 женщин, у всех заболевание началось (дебют) в возрасте менее 35 лет. Средний возраст к началу заболевания – 18 ± 8 лет. У 102 больных РС имел ремиттирующее течение, у двоих – первично-

прогрессирующее. Все семьи проживали в Московском регионе, оба родителя каждого больного были русскими. Во всех случаях получено информированное согласие больных и/или их родителей на участие в исследовании.

Выделение ДНК и генотипирование

Геномную ДНК выделяли из мононуклеарных клеток крови с помощью экстракции смесью фенол-хлороформ по стандартному протоколу [33].

Полиморфные участки анализируемых генов, методы генотипирования на основе ПЦР и использованные праймеры приведены в *табл. 1*. Типирование гена *HLA-DRB1* проводили методом аллель-специфической ПЦР согласно рекомендациям производителя набора (АО «ДНК Технология», Россия), с помощью которого идентифицировали группы аллелей, соответствующие серологическим специфичностям от DR1 до DR18.

Статистическая обработка результатов

Анализ сцепления и ассоциации аллелей рассматриваемых генов с РС методом TDT [6] с помощью критерия χ^2 проводили с использованием свободно распространяемой программы Haploview 3.32 для биаллельных полиморфных участков, FBAT [35] – для мультиаллельного полиморфизма гена *HLA-DRB1* и полиморфизма гена *TIMP1*, находящегося на X-хромосоме. Передачу аллелей гена больным РС детям от родителей анализировали в тех семьях, где по крайней мере один родитель был гетерозиготным по этому гену. Значимым считали различие частот перенесенных и неперенесенных аллелей при значении $\chi^2 > 3.8$ ($p < 0.05$). Для анализа методом AFBAC ассоциации аллелей рассматриваемых генов с РС составляли контрольную группу из аллелей обоих родителей, не перенесенных больным детям; значение вероятности (p) оценивали с помощью двустороннего точного критерия Фишера с применением программы GraphPAD InStat 1.12a.

Отклонение наблюдаемого распределения частот генотипов в группах больных и их здоровых родителей от равновесного распределения Харди-Вайнберга анализировали с помощью алгоритма максимизации математического ожидания (expectation maximization) с использованием программы Haploview 3.32.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ДНК всех членов 104 ядерных семей проведено геномное типирование полиморфных участков, приведенных в *табл. 1*. Из дальнейшего анализа исключили четыре семьи, в которых по результатам генотипирования отцовство не было подтверждено. Анализ частот

Таблица 1. Полиморфные участки анализируемых генов, методы генотипирования и использованные праймеры

Ген	Полиморфизм*	SNP ID	Метод анализа (ссылка)	Праймеры для ПЦР [используемая рестриктаза]
HLA-DRB1	Группы аллелей 01–18, соответствующие специфичностям DR1–DR18	-	ПЦР с АСП	из набора для амплификации HLA-DRB1 (АО «ДНК Технология», Россия)
CTLA4	SNP 49A>G (17Thr → Ala)	rs231775	ПЦР-ПДРФ [34]**	5'-AAGGCTCAGCTGAACCTGGT и 5'-CTGCTGAAACAAATGAAACCC [BstEII]
TGFB1	SNP -509C>T	rs1800469	ПЦР с АСП	5'-GGGCAACAGGACACCTGAA-3' (АСП Т), 5'-GGGCAACAGGACACCTGAG-3' (АСП С) и 5'-AAGGCATGGCACCGCTTCTG-3' (общий прямой)
IL4	SNP -590C>T	rs2243250	ПЦР с АСП	5'-СТАААСТТGGGAGAАСАТТGTC-3' (АСП С), 5'-СТАААСТТGGGAGAАСАТТGTT-3' (АСП Т) и 5'-AGTACAGGTGGCATCTTGGAAA-3' (общий обратный)
CCR5	(w → d) («дикий тип» → делеция 32 п.н.)	-	ПЦР	5'-AGGTCTTTCATTACACCTGCAGC-3' и 5'-CTTCTCATTTTCGACACCGAAGC-3'
RANTES	SNP -403G>A	rs2107538	ПЦР с АСП	5'-CCATGGATGAGGGAAAGGAGG-3' (АСП G), 5'-CCATGGATGAGGGAAAGGAGA-3' (АСП А) и 5'-AGGGAAGGGGTCTCCTCAG-3' (общий обратный)
MMP9	SNP -1562C>T	rs3918242	ПЦР-ПДРФ	5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC-3' и 5'-CTTCTTAGCCAGCCGGCATC-3' [SphI]
TIMP1	SNP 372C>T	rs4898	ПЦР с АСП	5'-CTGTTCCAGGGAGCCACG-3' (АСП С), 5'-CTGTTCCAGGGAGCCACA-3' (АСП Т) и 5'-AGCGAGGAGTTTCTCATTTGCT-3' (общий прямой)

*Все положения SNP указаны относительно участков старта транскрипции, за исключением *CTLA4* 49A>G, где 49 – положение относительно участка старта трансляции.

**Ссылка приведена в случае, когда использовали описанную методику.

Примечание. АСП – аллель-специфический праймер; ПДРФ – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов.

генотипов с помощью программы Harpview 3.32 показал, что у больных РС и их родителей распределение частот генотипов по всем генам соответствует равновесию Харди–Вайнберга ($p < 0.05$).

Методом TDT рассчитан показатель χ^2 , характеризующий отклонение наблюдаемых частот наследования аллелей генов *HLA-DRB1*, *CTLA4*, *TGFB1*, *IL4*, *CCR5*, *RANTES*, *MMP9* и *TIMP1* больными детьми из 100 ядерных семей от величин, ожидаемых при отсутствии взаимосвязи между аллелем и заболеванием. По величине χ^2 рассчитано значение p (табл. 2). В результате анализа обнаружено значимое сцепление/ассоциация с РС аллелей *HLA-DRB1**15 ($\chi^2 = 5.7$, $p = 0.02$) и *MMP9**(-1562)C ($\chi^2 = 4.1$, $p = 0.04$). Для остальных полиморфных участков значимых результатов не получили ($\chi^2 < 3.8$, $p > 0.05$). Методом TDT не выявлено сцепления/ассоциации ни одного из анализируемых полиморфных участков с РС в выделенных группах мужчин и женщин по отдельности.

В табл. 3 представлены результаты анализа методом AFBAC ассоциации РС с аллелями исследуемых

полиморфных участков. Сравнение частоты аллелей у больных детей и в контрольной группе, составленной из аллелей матерей и отцов, не переданных детям, выявило значимую ассоциацию РС только с аллелем *HLA-DRB1**15 ($p = 0.02$), но не с аллелями других генов.

Несмотря на ряд преимуществ семейного ассоциативного анализа перед популяционным, во всем мире, и тем более в России, такие исследования относительно редки из-за сложности сбора материала ядерных семей. Помимо проблемы неполных семей, достаточно широко встречается ложное отцовство. Так, скорее всего, по этой причине нам пришлось исключить из исследования четыре семьи из 104.

Гены, участие которых в развитии РС мы исследовали методами семейного анализа, можно разделить на две группы по степени изученности у русских. К первой группе относятся гены *HLA-DRB1*, *CTLA4*, *TGFB1* и *CCR5*, ассоциацию полиморфизма которых с РС мы анализировали ранее методом «случай–контроль», формируя контрольную группу

Таблица 2. Передача детям, больным рассеянным склерозом, аллелей полиморфных участков генов *HLA-DRB1*, *CTLA4*, *TGFB1*, *IL4*, *CCR5*, *RANTES*, *MMP9* и *TIMP1* от здоровых гетерозиготных родителей в 100 ядерных семьях (анализ методом TDT)*

Ген	Аллель	Число гетерозиготных родителей	Передается, число случаев	Не передается, число случаев	χ^2	<i>p</i>
<i>DRB1</i>	01	35	22	13	2.3	>0.05
	04	34	16	18	0.2	>0.05
	07	36	18	18	0.0	>0.05
	08	12	4	8	1.3	>0.05
	11	53	24	29	0.5	>0.05
	13	37	18	19	0.1	>0.05
	15	70	45	25	5.7	0.02
	16	11	3	8	2.3	>0.05
<i>CTLA4</i>	A	104	51	53	0.04	>0.05
	G		53	51		
<i>TGFB1</i>	C	101	48	53	0.3	>0.05
	T		53	48		
<i>IL4</i>	C	69	32	37	0.4	>0.05
	T		37	32		
<i>CCR5</i>	w	39	20	19	0.03	>0.05
	d		19	20		
<i>RANTES</i>	G	63	31	32	0.1	>0.05
	A		32	31		
<i>MMP9</i>	C	48	31	17	4.1	0.04
	T		17	31		
<i>TIMP1**</i>	C	49	28	21	0.5	>0.05
	T		21	28		

*Данные для аллелей *DRB1*09*, **10*, **12* и **14*, число носителей которых среди здоровых родителей ≤ 5 (2.5%) были незначимыми и не представлены в табл. 2 и 3.

**Поскольку ген *TIMP1* находится на X-хромосоме, рассматривали передачу аллелей больным детям только от гетерозиготных матерей.

из индивидов, неродственных больным. Во вторую группу входят гены *IL4*, *RANTES*, *MMP9* и *TIMP1*, которые ранее подробно не изучали.

Репликация (валидация) данных о вовлеченности того или иного гена в развитие заболевания на независимых выборках считается в настоящее время непременным условием для признания полученных результатов мировым научным сообществом. В нашей работе это требование оказалось полностью выполненным для генов первой группы. Выявленная методами TDT и AFBAC ассоциация PC у русских с аллелем *DRB1*15* HLA класса II показана нами ранее в популяционных исследованиях [36, 37]. В то же время мы не наблюдали ассоциации PC с аллелями генов *CTLA4*, *TGFB1* и *CCR5* ни при семейном анализе в этой работе, ни при исследовании методом «случай–контроль» на независимых выборках неродственных индивидов [37–39].

Ранее с помощью метода TDT мы показали также сцепление/ассоциацию аллеля *DRB1*15* HLA класса II с PC у детей и подростков (так называемый ювенильный PC с дебютом в возрасте моложе 15 лет) [11]. Поскольку мы располагали ДНК всего 39 ядерных семей, анализ проводили как для биаллельного локуса, сравнивая носителей аллеля *DRB1*15* с носителями этого аллеля (т.е. с носителями всех других аллелей гена *DRB1*). В настоящей работе впервые проведен анализ сцепления и ассоциации с PC всех исследуемых аллелей мультиаллельного полиморфизма гена HLA-*DRB1* у русских и подтверждена не только ассоциация, но и сцепление с PC аллеля *DRB1*15*, причем независимо от возраста дебюта.

Данные об ассоциации с PC полиморфизма *CCR5* (w→d) [40–42] и SNP 49A>G *CTLA4* у других европеоидов [43–45] противоречивы, тогда как ассоциации SNP –509C>T *TGFB1* с PC не наблюдали [46–48].

Таблица 3. Семейный анализ методом АFBAC ассоциации с рассеянным склерозом аллелей генов HLA-DRB1, CTLA4, TGFB1, IL4, CCR5, RANTES, MMP9 и TIMP1 в 100 ядерных семьях

Ген	Аллель	Число (%) аллелей у больных РС (n = 200)	Число (%) аллелей, не переданных больным детям от родителей (n = 200)	p
DRB1	01	25 (12.5)	16 (8)	>0.05
	04	22 (11.0)	25 (12.5)	>0.05
	07	22 (11.0)	22 (11.0)	>0.05
	08	5 (2.5)	9 (4.5)	>0.05
	11	25 (12.5)	30 (15)	>0.05
	13	21 (10.5)	22 (11)	>0.05
	15	50 (25)	30 (15)	0.02
	16	3 (1.5)	8 (4)	>0.05
CTLA4	A	113 (57)	103 (52)	>0.05
	G	87 (43)	97 (48)	
TGFB1	C	132 (66)	137 (69)	>0.05
	T	68 (34)	63 (31)	
IL4	C	158 (79)	165 (83)	>0.05
	T	42 (21)	35 (17)	
CCR5	w	179 (90)	178 (89)	>0.05
	d	21 (10)	22 (11)	
RANTES	G	163 (82)	164 (82)	>0.05
	A	37 (18)	36 (18)	
MMP9	C	120 (60)	105 (53)	>0.05
	T	80 (40)	95 (47)	
TIMP1	C	88 (56)	80 (55)	>0.05
	T	68 (44)	65 (45)	

Что касается гена DRB1, то он является главным генетическим фактором риска РС у всех европеоидов, хотя в некоторых средиземноморских популяциях обнаружены ассоциации РС не с DRB1*15, а с другими аллелотипами [2].

Отсутствие индивидуальной ассоциации полиморфных участков генов CTLA4, TGFB1 и CCR5 с РС не исключает их возможной роли как генетических факторов риска заболевания в составе сочетаний нескольких аллелей/генотипов. Действительно, аллели CTLA4*49G, TGFB1*(-509)C и CCR5*d входят в состав предрасполагающих к РС би- и триаллельных сочетаний с аллелями других генов, найденных нами с помощью алгоритма APSampler [37]. В других работах выявлены ассоциированные с РС у европеоидов сочетания аллелей генов CTLA4 и TGFB1 [2]. Вопрос о том, чем определяется ассоциация аллельных сочетаний с полигенными заболеваниями – аддитивностью вклада отдельных генов или ген-генными взаимодействиями – остается открытым.

Среди генов, которые мы впервые типировали методом TDT в выборке русских больных РС, показана неслучайная передача от здоровых родителей

больному ребенку аллеля MMP9*(-1562)C. С предположением об участии этого аллеля в развитии РС согласуются результаты, полученные на других популяциях славян – в Сербии [49] и Чехии [50], в которых наблюдалось значимое снижение частоты аллеля T у больных РС по сравнению со здоровыми индивидами. Однако в нашей работе эти результаты не получили подтверждения методом АFBAC, а по данным [51] у поляков аллель T выступает в качестве аллеля предрасположенности к РС. Таким образом, вопрос об участии гена MMP9 в формировании предрасположенности к РС требует дальнейшего изучения.

Мы не выявили ассоциации полиморфных участков генов IL4, RANTES и TIMP1 с РС при использовании двух методов семейного анализа. Опубликованы данные, согласно которым в Германии SNP -590C>T гена IL4 ассоциирован с РС, особенно у женщин [52]. У испанцев с РС ассоциирован SNP 33C>T гена IL4, находящийся в полном неравновесии по сцеплению с SNP -590C>T этого гена [53]. Результаты исследования, проведенного в Иране, согласуются с нашими данными об отсутствии сцепления/ассоциации участка 33C>T IL4 с РС [54]. Связь SNP -403G>A

RANTES с РС исследована мало, однако в единственной найденной нами работе наблюдали ассоциацию этого полиморфизма с РС у европеоидов [55]. Данные об анализе участка 372С>Т гена *TIMP1* при РС не опубликованы.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе методами семейного анализа сцепления и/или ассоциации, позволяющими исключить или уменьшить влияние возможной этнической неоднородности использованной выборки на полученные результаты, проанализирована роль полиморфных участков генов *HLA-DRB1*, *CTLA4*,

TGFB1, *IL4*, *CCR5*, *RANTES*, *MMP9* и *TIMP1* в развитии полигенного заболевания – РС, у этнических русских. Полученные методом TDT данные свидетельствуют о сцеплении/ассоциации аллелей *DRB1*15* и *MMP9*(-1562)C* с РС, а метод АФВАС подтвердил ассоциацию *DRB1*15* с этим заболеванием. Проведенное исследование указывает на перспективность изучения полигенных заболеваний с использованием семейного анализа. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 05-04-48982 и 08-04-01834).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dyment D.A., Ebers G.C., Sadovnick A.D. // *Lancet Neurol.* 2004. V. 3. № 2. P. 104–110.
- Фаворова О.О., Кулакова О.Г., Бойко А.Н. // *Генетика.* 2010. Т. 46. № 3. С. 302–313.
- Risch N.J. // *Nature.* 2000. V. 405. № 6788. P. 847–856.
- Hattersley A.T., McCarthy M.I. // *Lancet.* 2005. V. 366. № 9493. P. 1315–1323.
- Spielman R.S., McGinnis R.E., Ewens W.J. // *Am. J. Hum. Genet.* 1993. V. 52. № 3. P. 506–516.
- Spielman R.S., Ewens W.J. // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 59. № 5. P. 983–989.
- Marrosu M.G., Murru R., Costa G., Melis M.C., Rolesu M., Schirru L., Solla E., Cuccu S., Secci M.A., Whalen M.B., et al. // *BMC Genet.* 2007. V. 8. P. 25.
- Cuturier N., Gourraud P.A., Cournu-Rebeix I., Gout C., Bucciarelli F., Edan G., Babron M.C., Clerget-Darpoux F., Clanet M., Fontaine B., Brassat D. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2009. V. 17. № 6. P. 844–847.
- D'Alfonso S., Bolognesi E., Guerini F.R., Barizzone N., Bocca S., Ferrante D., Castelli L., Bergamaschi L., Agliardi C., Ferrante P., et al. // *Genes Immun.* 2008. V. 9. № 1. P. 7–15.
- Chao M.J., Barnardo M.C., Lui G.Z., Lincoln M.R., Ramagopalan S.V., Herrera B.M., Dyment D.A., Sadovnick A.D., Ebers G.C. // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16. № 16. P. 1951–1958.
- Boiko A.N., Gusev E.I., Sudomoina M.A., Alekseenkov A.D., Kulakova O.G., Bikova O.V., Maslova O.I., Guseva M.R., Boiko S.Y., Guseva M.E., Favorova O.O. // *Neurology.* 2002. V. 58. № 4. P. 658–660.
- Макарычева О.Ю., Царева Е.Ю., Судомойна М.А., Кулакова О.Г., Быкова О.В., Гольцова Н.В., Кузенкова Л.М., Бойко А.Н., Фаворова О.О. // *Молекуляр. биология.* 2010. Т. 44. № 5. С. 824–830.
- Hafner D.A., Compston A., Sawcer S., Lander E.S., Daly M.J., De Jager P.L., de Bakker P.I., Gabriel S.B., Mirel D.B., Ivinson A.J., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2007. V. 357. № 9. P. 851–862.
- Willer C.J., Dyment D.A., Cherny S., Ramagopalan S.V., Herrera B.M., Morrison K.M., Sadovnick A.D., Risch N.J., Ebers G.C. // *J. Hum. Genet.* 2007. V. 52. № 12. P. 955–962.
- Giedraitis V., Modin H., Callander M., Landtblom A.M., Fossdal R., Stefansson K., Hillert J., Gulcher J. // *Genes Immun.* 2003. V. 4. № 8. P. 559–563.
- Thomson G. // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. V. 57. № 2. P. 487–498.
- Liguori M., Sawcer S., Setakis E., Compston A., Giordano M., D'Alfonso S., Mellai M., Malferrari G., Trojano M., Livrea P., et al. // *J. Neuroimmunol.* 2003. V. 143. № 1–2. P. 97–100.
- Lampis R., Morelli L., Congia M., Macis M.D., Mulargia A., Loddo M., De Virgili S., Marrosu M.G., Todd J.A., Cucca F. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 20. P. 2959–2965.
- Yeo T.W., Roxburgh R., Maranian M., Singlehurst S., Gray J., Hensiek A., Setakis E., Compston A., Sawcer S. // *J. Neuroimmunol.* 2003. V. 143. № 1–2. P. 53–59.
- Goris A., Sawcer S., Vandenbroeck K., Carton H., Billiau A., Setakis E., Compston A., Dubois B. // *J. Neuroimmunol.* 2003. V. 143. № 1–2. P. 65–69.
- Alizadeh M., Genin E., Babron M.C., Birebent B., Cournu-Rebeix I., Yaouanq J., Dreano S., Sawcer S., Compston A., Clanet M., et al. // *J. Neuroimmunol.* 2003. V. 143. № 1–2. P. 74–78.
- Schulze T.G., McMahon F.J. // *Am. J. Med. Genet.* 2002. V. 114. № 1. P. 1–11.
- Racke M.K., Ratts R.B., Arredondo L., Perrin P.J., Lovett-Racke A. // *J. Neuroimmunol.* 2000. V. 107. № 2. P. 205–215.
- Imitola J., Chitnis T., Khoury S.J. // *Pharmacology and Therapeutics.* 2005. V. 106. P. 163–177.
- Szczuciński A., Losy J. // *Acta Neurol. Scand.* 2007. V. 115. № 3. P. 137–146.
- Ram M., Sherer Y., Shoenfeld Y. // *J. Clin. Immunol.* 2006. V. 26. № 4. P. 299–307.
- Grainger D.J., Heathcote K., Chiano M., Snieder H., Kemp P.R., Metcalfe J.C., Carter N.D., Spector T.D. // *Hum. Mol. Genet.* 1999. V. 8. P. 93–97.
- Rosenwasser L.J., Klemm D.J., Dresback J.K., Inamura H., Mascali J.J., Klinnert M., Borish L. // *Clin. Exp. Allergy.* 1995. V. 25. № 2. Suppl. P. 74–78.
- Nickel R.G., Casolaro V., Wahn U., Beyer K., Barnes K.C., Plunkett B.S., Freidhoff L.R., Sengler C., Plitt J.R., Schleimer R.P., et al. // *J. Immunol.* 2000. V. 164. P. 1612–1616.
- Zhang B., Ye S., Herrmann S.M., Eriksson P., de Maat M., Evans A., Arveiler D., Luc G., Cambien F., Hamsten A., et al. // *Circulation.* 1999. V. 99. P. 1788–1794.
- Ligers A., Teleshova N., Masterman T., Huang W.X., Hillert J. // *Genes Immun.* 2001. V. 2. P. 145–152.
- McDonald W.I., Compston A., Edan G., Goodkin D., Hartung H.P., Lublin F.D., McFarland H.F., Paty D.W., Polman C.H., Reingold S.C., et al. // *Ann. Neurol.* 2001. V. 50. № 1. P. 121–127.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 923 p.
- Marron M.P., Raffel L.J., Garchon H.J., Jacob C.O., Serrano-

- Rios M., Martinez Larrad M.T., Teng W.P., Park Y., Zhang Z.X., Goldstein D.R., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 1997. V. 6. № 8. P. 1275–1282.
35. Laird N.M., Horvath S., Xu X. // *Genet. Epidemiol.* 2000. V. 19. № 1. Suppl. P. S36–S42.
36. Судомоина М.А., Бойко А.Н., Демина Т.Л., Гусев Е.И., Болдырева М.Н., Трофимов Д.Ю., Алексеев Л.П., Фаворова О.О. // *Молекуляр. биология.* 1998. Т. 32. С. 291–296.
37. Favorova O.O., Favorov A.V., Boiko A.N., Andreewski T.V., Sudomoina M.A., Alekseenkov A.D., Kulakova O.G., Gusev E.I., Parmigiani G., Ochs M.F. // *BMC Med. Genet.* 2006. V. 7. P. 63.
38. Favorova O.O., Andreewski T.V., Boiko A.N., Sudomoina M.A., Alekseenkov A.D., Kulakova O.G., Slanova A.V., Gusev E.I. // *Neurology.* 2002. V. 59. № 2. P. 1652–1655.
39. Андреевский Т.В., Судомоина М.А., Гусев Е.И., Бойко А.Н., Алексеев А.Д., Фаворова О.О. // *Молекуляр. биология.* 2002. Т. 36. № 4. С. 643–648.
40. Ristic S., Lovrecic L., Starcevic-Cizmarevic N., Brajenovic-Milic B., Jazbec S.S., Barac-Latas V., Vejnovic D., Sepcic J., Kapovic M., Peterlin B. // *Mult. Scler.* 2006. V. 12. № 3. P. 360–362.
41. Silversides J.A., Heggarty S.V., McDonnell G.V., Hawkins S.A., Graham C.A. // *Mult. Scler.* 2004. V. 10. № 2. P. 149–152.
42. Pulkkinen K., Luomala M., Kuusisto H., Lehtimaki T., Saarela M., Jalonen T.O., Elovaara I. // *Acta Neurol. Scand.* 2004. V. 109. № 5. P. 342–347.
43. Malferrari G., Stella A., Monferini E., Saltini G., Proverbio M.C., Grimaldi L.M., Rossi-Bernardi L., Biunno I. // *Exp. Mol. Pathol.* 2005. V. 78. № 1. P. 55–57.
44. Rasmussen H.B., Kelly M.A., Francis D.A., Clausen J. // *J. Neurol. Sci.* 2001. V. 184. № 2. P. 143–147.
45. Fukazawa T., Yanagawa T., Kikuchi S., Yabe I., Sasaki H., Hamada T., Miyasaka K., Gomi K., Tashiro K. // *J. Neurol. Sci.* 1999. V. 171. № 1. P. 49–55.
46. Arthur A.T., Armati P.J., Bye C., Heard R.N., Stewart G.J., Pollard J.D., Booth D.R. // *BMC Med. Genet.* 2008. V. 9. P. 17.
47. Weinschenker B.G., Hebrink D., Kantarci O.H., Schaefer-Klein J., Atkinson E., Schaid D., McMurray C.M. // *J. Neuroimmunol.* 2001. V. 120. № 1–2. P. 138–145.
48. Green A.J., Barcellos L.F., Rimmler J.B., Garcia M.E., Caillier S., Lincoln R.R., Bucher P., Pericak-Vance M.A., Haines J.L., Hauser S.L., Oksenberg J.R. // *J. Neuroimmunol.* 2001. V. 116. № 1. P. 116–124.
49. Zivkovic M., Djuric T., Dincic E., Raicevic R., Alavantic D., Stankovic A. // *J. Neuroimmunol.* 2007. V. 189. № 1–2. P. 147–150.
50. Benesova Y., Vasku A., Stourac P., Hladikova M., Beranek M., Kadanka Z., Novotna H., Bednarik J. // *J. Neuroimmunol.* 2008. V. 205. № 1–2. P. 105–109.
51. Mirowska-Guzel D., Gromadzka G., Czlonkowski A., Czlonkowska A. // *J. Neuroimmunol.* 2009. V. 214. № 1–2. P. 113–117.
52. Akkad D.A., Arning L., Ibrahim S.M., Epplen J.T. // *Genes Immun.* 2007. V. 8. № 8. P. 703–706.
53. Urcelay E., Santiago J.L., Mas A., Martinez A., de Las Heras V., Arroyo R., de la Concha E.G. // *J. Neuroimmunol.* 2005. V. 168. № 1–2. P. 164–167.
54. Kamali-Sarvestani E., Nikseresht A., Aflaki E., Sarvari J., Gharesi-Fard B. // *Acta Neurol. Scand.* 2007. V. 115. № 3. P. 161–166.
55. Gade-Andavolu R., Comings D.E., MacMurray J., Vuthoori R.K., Tourtellotte W.W., Nagra R.M., Cone L.A. // *Mult. Scler.* 2004. V. 10. № 5. P. 536–539.

УДК 577.151.34; 577.151.64

Сравнительный биоинформатический анализ структур активных центров эволюционно удаленных гомологов суперсемейства ферментов α, β -гидролаз

Д. А. Суплатов^{1,2}, В. К. Аржаник¹, В. К. Швядас^{1,2*}¹Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73²Государственное учреждение Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

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

Поступила в редакцию 25.02.2011 г.

РЕФЕРАТ Сравнительный биоинформатический анализ ферментов является важным шагом в изучении взаимосвязи их структуры и функции. Однако многие ферменты, произошедшие от одного предка и претерпевшие значительные функциональные изменения в ходе естественного отбора, не обладают достаточным сходством по аминокислотным последовательностям для проведения статистически достоверного сравнительного анализа. При этом пространственная организация активных центров таких ферментов может быть консервативной, а остальные части структуры принципиально отличаются. В связи с этим при изучении общих принципов организации гомологичных ферментов представляется целесообразным проводить сравнительный биоинформатический анализ наиболее важных с функциональной точки зрения элементов структуры – активных центров, т.е. аминокислотных остатков, формирующих участки связывания субстрата и участвующих в механизме каталитического превращения. Для создания библиотеки трехмерных структур активных центров ферментов разработан алгоритм, основанный на использовании базы данных структур белков PDB, алгоритмов структурного анализа, а также идентификации функционально важных аминокислотных остатков и полостей в структуре фермента. Предложенный подход был использован для сравнения ряда ферментов суперсемейства α, β -гидролаз и позволил показать консервативность значительной части структуры активных центров, в том числе организации оксианионных центров, а также остатков каталитической триады даже у удаленных гомологов. Разработанный алгоритм может использоваться при сравнении структурной организации каталитических участков и участков связывания субстратов в ферментах различных классов, а также при изучении эволюции ферментов и создании банка данных структур активных центров.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биоинформатика, сравнительный анализ, активный центр, структурное выравнивание, α, β -гидролазы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ PDB – Protein Data Bank; CSA – Catalytic Site Atlas

ВВЕДЕНИЕ

Сравнительный биоинформатический анализ гомологичных белков является важным шагом при изучении взаимосвязи их структуры и функции. Основной метод такого анализа – множественное выравнивание аминокислотных последовательностей. Признаком гомологии белков, т.е. происхождения от одного общего предка, принято считать достоверное сходство по аминокислотным последовательностям или третичным структурам [1], однако ферменты, претер-

певшие значительные функциональные изменения в результате естественного отбора, могут утратить сходство аминокислотных последовательностей. Сравнительный биоинформатический анализ таких белков по их первичной структуре становится практически невозможным.

В процессе эволюции аминокислотная последовательность изменяется с большей скоростью, чем структура [2, 3]. Известны ферменты, обладающие аминокислотной идентичностью на грани статисти-

ческой достоверности (8–15%) и при этом схожие по структуре, а также принципам организации каталитического механизма [4]. В противоположность алгоритмам выравнивания аминокислотных последовательностей, основанным на поиске биохимического сходства в гомологичных позициях первичной структуры [5–7], целью пространственного выравнивания является геометрическое сравнение элементов третичной структуры [8]. В настоящий момент в банке данных трехмерных моделей белков PDB насчитывается более 70000 записей, число которых ежегодно увеличивается [9]. Доступность этой информации предоставляет большие возможности для биоинформатического структурного анализа. Так, например, 3D-выравнивание позволило выявить сходство между ферментами семейства Ntn-гидролаз с низкой степенью сходства по последовательностям [10, 11]. Таким образом, при изучении структурно-функциональных взаимосвязей в семействах ферментов, состоящих из эволюционно дальних родственников, выравнивание третичных структур представляется значительно более информативным и точным, чем выравнивание их аминокислотных последовательностей.

Опыт сравнительного анализа позволяет предположить, что пространственная организация активного центра – наиболее консервативный элемент структуры гомологичных ферментов, в то время как остальные элементы могут принципиально отличаться (рис. 1) [12–15]. Укладка полипептидной цепи и расположение боковых радикалов аминокислот в активном центре определяет характер взаимодействий, необходимых для узнавания, связывания и превращения субстрата. Кроме того, аминокислотные остатки, влияющие на субстратную специфичность и каталитическую активность, как правило, находятся в радиусе 7–15 Å от ключевых каталитических аминокислотных остатков [16]. В связи с этим при изучении закономерностей организации гомологичных ферментов необходимо проводить сравнительный анализ на трех уровнях: аминокислотной последовательности, третичной структуры и структурной организации активных центров. Сравнительный биоинформатический анализ наиболее важных с функциональной точки зрения элементов структуры – активных центров – представляет особый интерес.

В работе предложен алгоритм для создания базы данных структур активных центров ферментов, основанный на использовании базы данных структур белков PDB, алгоритмов структурного анализа, а также идентификации функционально важных аминокислотных остатков и полостей в структуре фермента. Предложенный подход использован для сравнения ряда ферментов суперсемейства α , β -гидролаз.

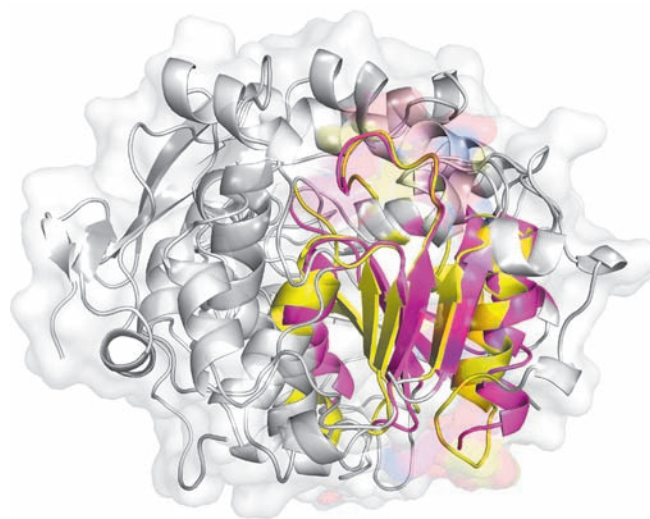


Рис. 1. Структурное выравнивание липазы Б (1TCB) и оксинитрипазы (1YB6). Наиболее консервативные области, содержащие аминокислотные остатки активного центра, у обоих ферментов выделены цветом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка выборки гомологичных ферментов

Поиск структурного сходства выполняли по отношению к липазе Б из *Candida antarctica* по всему банку данных PDB с помощью программы SSM [8]. Полученные результаты фильтровали с учетом процента совпавших элементов вторичной структуры при наложении на структуру 1TCB (не менее 30% элементов вторичной структуры должны совпадать у обоих белков при парном наложении). Поиск гомологичных ферментов по сходству аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы PSI-BLAST [7] по базе данных «Non-redundant». Последовательности, идентичные более чем на 95%, группировали в кластеры, из которых для последующего анализа отбирали только одного представителя.

Подготовка множественного выравнивания

Для множественного структурного выравнивания полноразмерных структур и активных центров ферментов использовали программы t-coffee [17] и Mustang [18].

Визуализация

Структурный анализ проводили с помощью программы Rymol [19]. Программу Jalview [20] использовали для просмотра выравниваний аминокислотных последовательностей.

Статистический анализ выравнивания

Для оценки консервативности колонки I выравнивания использовали параметр, предложенный Valdar и Thornton [21]:

$$C_I = \gamma \sum_i^N \sum_{j>i}^N w_i w_j M(s_i, s_j),$$

где M обозначает матрицу аминокислотных переходов, s_i и s_j – аминокислоты в последовательностях i и j в колонке I , а нормализующий множитель γ рассчитывается как

$$\gamma = \left(\sum_i^N \sum_{j>i}^N w_i w_j \right)^{-1}.$$

Параметры w_i и w_j обозначают веса соответствующих последовательностей в формулировке Vingron и Argos [22]:

$$w_i = \frac{1}{N-1} \sum_{j \neq i}^N d(s_i, s_j),$$

где d – «генетическое» расстояние между последовательностями i и j , выраженное через процент парной идентичности.

В окончательном варианте оценку консервативности колонки i выражали через Z -оценку стандартного нормального распределения:

$$Z_i = \frac{C_i - \langle C_i^{случ} \rangle}{\sigma(C_i^{случ})},$$

где $C_i^{случ}$ – оценка консервативности, вычисленная по случайным образом составленным колонкам выравнивания.

Достоверность рассчитанных Z -оценок консервативности определяли с использованием процедуры ранговой статистики Бернулли B -cutoff [23, 24]. Полученные на предыдущем этапе Z -оценки сортировали по убыванию, после чего ранг k рассчитывали таким образом, чтобы первые k -оценок (соответствующие первым k -колонкам выравнивания) представляли результаты, которые с наименьшей вероятностью могут возникнуть в случайном распределении:

$$k = \arg_k \min P(\text{there are at least } k \text{ } Z\text{-scores } Z \geq Z_k) =$$

$$\arg_k \min \left(1 - \sum_{i=n-k+1}^n C_n^i q^i p^{n-i} \right),$$

где n – общее число посчитанных Z -оценок, C_n^i – биномиальный коэффициент, а

$$p = P(Z \geq Z_k) = \int_{Z_k}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-Z^2) dZ, \quad q = 1 - p.$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Принципиально новую информацию о структурных особенностях организации гомологичных ферментов можно получить путем сравнительного биоинформатического анализа не полноразмерных пространственных структур, а активных центров. При этом под «активным центром» следует понимать не только аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в катализе, но также аминокислоты, формирующие участок (полость) протекания каталитического превращения, которые могут так или иначе взаимодействовать с субстратом или «каталитическими» аминокислотными остатками и опосредовать влияние особенностей структуры на каталитические свойства фермента. Однако для того, чтобы проводить биоинформатический анализ строения активных центров ферментов, необходимо создать библиотеку таких структур. Для локализации и изоляции структуры активного центра фермента (рис. 2) был разработан следующий алгоритм, состоящий из трех этапов:

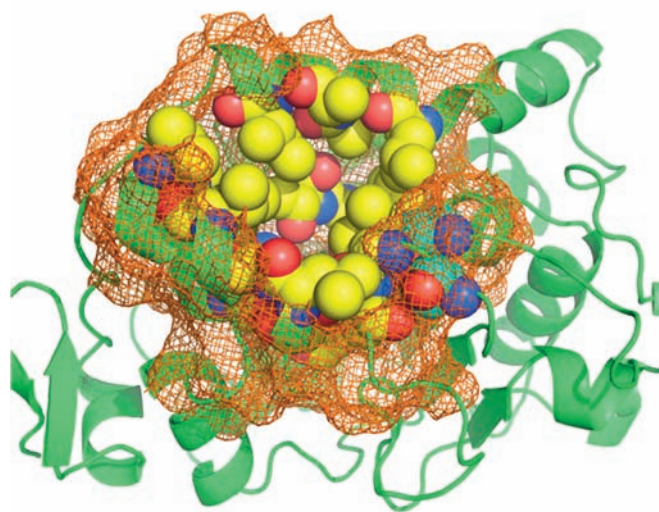


Рис. 2. Область активного центра – фрагмент полноразмерной структуры фермента, состоящий из аминокислотных остатков, которые взаимодействуют с функциональными группами субстрата как в процессе доставки (диффузии) субстрата в активный центр, так и при его ориентации в активном центре (показаны желтым), а также аминокислотных остатков, обеспечивающих функционирование каталитического механизма (показаны синим), и ряда окрестных остатков, формирующих целостность выделенного фрагмента (показано сеткой).

1. Идентификация аминокислотных остатков активного центра, вовлеченных в каталитический механизм. Это могут быть остатки, принимающие непосредственное участие в каталитическом акте (например, в качестве нуклеофила), изменяющие кислотно-основные свойства аминокислотного остатка или молекулы воды, которая участвует в катализе, и стабилизирующие переходное состояние или интермедиат ферментативной реакции. База данных Catalytic Site Atlas (CSA) [25] содержит аннотацию аминокислотных остатков, вовлеченных в катализ, для ферментов, представленных в банке данных PDB. CSA представлена в открытом доступе в Интернете <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA> и содержит два уровня информации: оригинальную аннотацию аминокислот, составленную вручную на основе анализа опубликованных данных, а также ее экстраполяцию на гомологичные ферменты, определенные с помощью программы PSI-BLAST [7]. В тех случаях, когда фермент не аннотирован в базе данных CSA, необходим поиск нужной информации или идентификация каталитически важных аминокислотных остатков с помощью программ биоинформатического анализа [26–28].

2. Определение аминокислотных остатков, обеспечивающих доставку, связывание и ориентацию субстрата в активном центре фермента. Связывание субстрата ферментами, как правило, происходит в так называемых карманах, впадинах на поверхности глобулы. Целый ряд аминокислотных остатков, формирующих область активного центра, непосредственно не участвует в каталитическом механизме, а взаимодействует с функциональными группами субстрата как в процессе его доставки (диффузии), так и при ориентации субстрата в активном центре фермента для обеспечения реакционноспособной конформации в результате связывания. Для нахождения аминокислотных остатков такого рода может быть использован алгоритм структурного анализа CASTp [29].

3. Создание координатного файла в формате PDB, содержащего область активного центра фермента. При этом к каталитически важным аминокислотным остаткам (этап 1) и аминокислотным остаткам участка связывания субстрата (этап 2) добавляются окружающие остатки, формирующие элементы вторичной структуры и связывающие их петли.

Таким образом, результатом работы алгоритма является фрагмент полноразмерной структуры фермента, который включает аминокислотные остатки области связывания и превращения субстрата, аминокислотные остатки, обеспечивающие функционирование каталитического механизма, а также некоторые окрестные остатки, формирую-

щие целостность выделенного фрагмента. Технически этот фрагмент сохраняется в виде координатного файла в формате PDB, при этом возможно дополнительное внесение информации о ферменте, его структуре и особенностях катализа из других баз данных. С помощью предложенного алгоритма можно создать базу данных активных центров для всех ферментов, информация о которых представлена в базе данных PDB.

Разработанный алгоритм был использован для сравнительного анализа некоторых ферментов семейства α, β -гидролаз – липазы Б из *S. antarctica* (структура 1TCB) [12], сериновой карбоксипептидазы из *Triticum aestivum* (1WHS) [30] и оксинитрилазы из *Hevea brasiliensis* (1YB6) [13], а также их гомологов, отобранных с помощью методов поиска сходства по структуре и аминокислотной последовательности (см. «Экспериментальную часть»). Идентичность по аминокислотным последовательностям между 1TCB и 1WHS составляет 7.8%, 1TCB и 1YB6 – 12.4%, 1WHS и 1YB6 – 13.7%. Такое низкое сходство не позволяет сравнивать ферменты при помощи выравнивания аминокислотных последовательностей. 3D-выравнивание полноразмерных структур также не обнаруживает достаточного сходства в пространственной организации указанных ферментов. Так, при использовании программы SSM [8] выравниваются только аминокислоты каталитической триады, однако не обнаруживается гомология аминокислотных остатков оксианионного центра; напротив, программа Mustang [18] позволяет выявить гомологичность аминокислотных остатков оксианионного центра и остатка каталитического серина, однако положение других остатков каталитической триады – гистидина и аспартата – между ферментами различается. Это означает, что при таком структурном выравнивании нахождение других функционально важных, но пока неизвестных элементов структуры, вряд ли представляется возможным, а ручная корректировка отдельных фрагментов выравнивания не может быть надежным способом повышения его качества. Такая неоднозначность в работе программ трехмерного выравнивания объясняется большими отличиями полноразмерных структур ферментов, катализирующих разные химические превращения – из 408 аминокислотных остатков структуры 1WHS сериновой карбоксипептидазы из *T. aestivum* только 161 остаток может быть пространственно сопоставлен со структурами липазы Б из *S. antarctica* 1TCB и оксинитрилазы из *H. brasiliensis* 1YB6. Поэтому для поиска сходства столь разных ферментов был проведен сравнительный анализ структур активных центров, подготовленных с помощью предложен-

Консервативные аминокислотные остатки в структурах активных центров липазы Б из *S. antarctica*, сериновой карбоксипептидазы из *T. aestivum* и оксинитриказы из *H. brasiliensis*, а также их гомологов

Ранг	Z-оценка	P-оценка	Позиция	Состав колонки выравнивания
1	5.909034	1.496923E-07	224H	NNNNN NNNNN ... NNNNN NH
2	5.909034	1.107511E-14	187D	DDDDD DDDDD ... DDDDD DD
3	5.909034	5.399159E-22	105S	SSSSS SSSSS ... SSSSS SS
4	5.585937	4.061221E-26	39G	GGGGG GGGGG ... GNTTG GG
5	4.976042	1.329205E-25	108G	GGGGG GGGGG ... AAAAA GG
6	3.643481	2.960176E-15	103T	GGGGG GGTTS ... STTSS AG
7	3.077561	7.318560E-12	107G	AAAAA AAGGG ... GGGGG GG
8	2.282191	6.757472E-06	106Q	YYYYY YYQLQ ... YFFYY FF
9	2.097392	2.845755E-05	190V	CCCCC CCCCC ... VVVVL LL
10	1.970983	5.325320E-05	184S	GGGGG GGGGG ... SNNSS NN
11	1.833495	1.540646E-04	80T	AAAAA AAAAA ... GAAVA YY
12	1.525180	8.996767E-03	42T	GGGGG GGGGG ... TRVAG GG
13	1.238283	1.410807E-01	132A	NNNNN NNNNN ... AAAAD DD
14	1.203052	1.191297E-01	133P	GGGGG GGGGG ... PPPPP PG
15	1.173696	9.573976E-02	82Y	DDDDD NNDSN ... QEEQQ YY

Примечание. Результаты биоинформатического анализа представлены в порядке уменьшения статистической достоверности (Z-оценка). P-оценка для позиции ранга *i* означает вероятность возникновения результатов с первого по *i* в случайном выравнивании. Нумерация позиций представлена по кристаллографической структуре 1ТСВ. Красным выделен порог наибольшей статистической достоверности.

ного алгоритма. Полученные структурные файлы включали 170 аминокислотных остатков для 1ТСВ (54% от полноразмерной структуры), 287 для 1WHS (70%) и 159 для 1YB6 (62%). Анализ множественного структурного выравнивания активных центров показал консервативность значительной части полипептидной цепи, причем наиболее консервативными являются аминокислотные остатки каталитической триады – Ser105, His224, Asp187 (нумерация по 1ТСВ, *таблица*). Аминокислотные остатки одного типа не только содержатся в одинаковых позициях структуры активных центров рассмотренных ферментов, но имеют схожую пространственную ориентацию (*рис. 3, 4*). При геометрическом сравнении активных центров ферментов, катализирующих разные химические превращения, также обнаруживается сходство в организации оксианионных центров – выравниваются участки структуры, содержащие аминокислотные остатки Thr40 в липазе Б, Ile12 в оксинитриказе и Gly53 в сериновой карбоксипептидазе. Другой остаток оксианионного центра – Gln106 в липазе Б, который следует за каталитическим Ser105, также выравнивается с гомологами в других ферментах: Tyr147 в сериновой

карбоксипептидазе и Cys81 в оксинитриказе. Вариабельность типов аминокислот в этих позициях объясняется тем, что стабилизация тетраэдрического интермедиата, как правило, происходит при участии аминогрупп основной цепи этих аминокислот [12, 13]. Такая тождественность структурной организации особенно интересна применительно к оксинитриказам, в каталитическом механизме действия которых образование тетраэдрического интермедиата и его стабилизация в оксианионном центре не происходит [31]. Таким образом, при сравнительном анализе структур активных центров удалось показать консервативность пространственной организации этих функционально важных участков эволюционно родственных, но удаленных ферментов: сериновой карбоксипептидазы из *T. aestivum*, липазы Б из *S. antarctica* и оксинитриказы из *H. brasiliensis*.

ВЫВОДЫ

Для создания библиотеки трехмерных структур активных центров ферментов разработан алгоритм, основанный на использовании базы данных структур белков PDB, алгоритмов структурного анализа, а также идентификации функционально важных

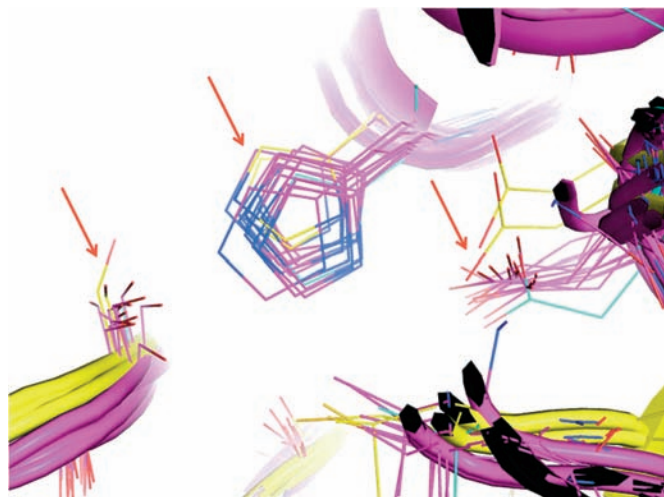


Рис. 3. Пространственное выравнивание структур активных центров ферментов семейства α, β -гидролаз: сериновой карбоксипептидазы из *T. aestivum*, липазы Б из *C. antarctica*, оксинитриказы из *H. brasiliensis*, а также их гомологов. Одинаковое расположение и ориентация аминокислотных остатков каталитической триады в структуре показаны стрелками.

аминокислотных остатков и полостей в структуре фермента. Предложенный подход был использован для сравнения ряда ферментов суперсемейства α, β -гидролаз. Проведенный биоинформатический анализ эволюционно родственных, но удаленных ферментов: сериновой карбоксипептидазы из *T. aestivum*, липазы Б из *C. antarctica* и оксинитриказы из *H. brasiliensis*, показал высокое сходство значительной части структуры активных центров, в то время как сходство полноразмерных третичных структур, а также аминокислотных последовательностей значительно ниже. Даже при существенном различии функциональных свойств и способности катализировать различные химические реакции сериновая карбоксипептидаза, липаза Б и оксинитриказа сохранили общую структурную организацию оксианионных центров и остатков каталитической триады. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при биоинформатическом анализе ферментов и изучении общих принципов биокатализа нельзя ограничиваться выравниванием аминокислотных последовательностей и третичных структур. Сравнительный биоинформатический анализ пространственной организации активных центров – наиболее важных с функциональной точки зрения элементов структуры – может позволить обнаружить сходство даже у отдаленных

TW	S	Q	G	G	L	L	Y	S	A	T	-	-	-	-	D	E	I	V	Q	I	D	H	A	G	-	-				
G	H	S	H	G	G	P	...	G	-	T	A	-	-	N	D	G	L	V	G	...	-	N	H	L	-	-				
G	H	S	Q	G	T	T	...	-	N	G	G	K	-	-	-	D	L	L	A	D	Y	N	H	L	-	-				
G	H	S	Q	G	G	L	G	S	G	Q	-	-	N	D	S	V	V	S	...	W	N	H	L	-	-			
G	H	S	Q	G	T	T	W	N	G	G	N	-	-	-	D	L	L	A	D	Y	N	H	L	-	-			
A	H	S	Q	G	G	Q	-	-	-	-	-	G	S	Y	N	-	D	S	I	V	N	...	-	D	H	L	-	-
A	H	S	Q	G	G	A	I	Y	S	S	A	-	-	-	D	M	I	V	M	...	V	G	H	I	-	-	-	-
G	H	S	Q	G	G	L	-	A	S	G	Q	-	-	N	-	D	G	L	V	S	...	W	N	H	L	-	-	-
G	H	S	Q	G	G	Q	-	W	R	P	-	-	N	-	D	G	L	V	S	...	W	D	H	L	-	-	-
A	H	S	Q	G	G	Q	-	G	S	-	-	-	-	D	S	I	V	N	...	-	D	H	L	-	-	-	
A	H	S	Q	G	G	Q	-	G	S	Y	N	-	-	-	D	G	I	V	N	...	-	D	H	L	-	-	-
G	G	S	W	G	S	T	V	H	G	R	Y	-	-	-	-	D	M	V	C	P	...	S	G	H	S	-	-	-
G	G	S	W	G	S	T	V	H	G	R	Y	-	-	-	-	D	M	A	C	Q	...	A	G	H	S	-	-	-
G	S	S	Y	G	G	A	T	V	G	E	Y	-	-	-	-	D	-	E	V	T	...	C	S	H	L	-	-	-
G	E	S	Y	A	G	H	F	S	G	D	T	-	-	-	-	D	A	V	V	P	...	A	G	H	E	V	P	L
G	E	S	Y	A	G	V	F	S	G	D	H	-	-	-	-	D	M	C	V	P	...	A	G	H	T	V	P	E
G	E	S	Y	A	G	H	F	S	G	D	T	-	-	-	-	D	A	V	V	P	...	A	G	H	E	V	P	L
G	E	S	Y	A	G	H	F	S	G	D	T	-	-	-	-	D	A	V	V	P	...	A	G	H	E	V	P	L
G	E	S	Y	A	G	I	Y	N	G	D	V	-	-	-	-	D	M	A	C	N	...	A	G	H	I	V	P	T
G	E	S	Y	A	G	I	Y	N	G	D	V	-	-	-	-	D	M	A	C	N	...	A	G	H	I	V	P	T
G	E	S	Y	A	G	H	Y	A	G	E	Y	-	-	-	-	D	L	I	C	N	...	A	G	H	M	V	P	M
G	E	S	Y	A	G	V	Y	S	G	D	H	-	-	-	-	D	M	C	V	P	...	A	G	H	T	V	P	E
G	E	S	Y	A	G	H	Y	A	G	E	Y	-	-	-	-	D	L	I	C	N	...	A	G	H	M	V	P	M
G	E	S	Y	A	G	H	Y	S	G	D	T	-	-	-	-	D	M	V	V	N	...	A	G	H	M	V	P	L
G	E	S	Y	A	G	H	Y	S	G	D	T	-	-	-	-	D	S	R	V	P	...	A	G	H	E	V	P	S
G	E	S	Y	A	G	H	F	S	G	D	T	-	-	-	-	D	A	V	I	P	...	A	G	H	E	V	P	L
G	D	S	Y	S	G	M	Y	S	G	D	H	-	-	-	-	D	I	A	V	P	...	G	G	H	T	A	E	-
G	E	S	Y	A	G	H	F	S	G	D	T	-	-	-	-	D	S	V	V	P	...	A	G	H	E	V	P	L
G	E	S	Y	A	G	H	F	S	G	D	T	-	-	-	-	D	A	V	V	P	...	A	G	H	E	V	P	L
G	E	S	Y	A	G	H	Y	A	G	D	K	-	-	-	-	D	F	I	C	N	...	G	H	M	V	P	F	
G	E	S	C	A	G	L	I	W	T	D	Q	-	-	-	-	D	K	I	F	L	...	G	D	H	K	L	Q	L
G	E	S	C	G	G	L	V	W	T	D	Q	-	-	-	-	D	E	I	F	L	...	G	D	H	K	L	Q	L
G	F	S	E	G	G	I	-	-	V	M	S	S	E	-	-	-	-	D	K	A	I	P	...	G	D	H	M	V	M	L

Рис. 4. Текстовое отображение пространственного выравнивания структур активных центров ферментов семейства α, β -гидролаз: сериновой карбоксипептидазы из *T. aestivum*, липазы Б из *C. antarctica*, оксинитриказы из *H. brasiliensis*, а также их гомологов. Консервативные аминокислотные остатки каталитической триады показаны пунктиром.

гомологов. Разработанный алгоритм может быть использован при сравнении структурной организации каталитических участков и участков связывания субстратов в ферментах различных классов, а также при изучении эволюции ферментов и для создания банка данных структур активных центров. Предложенный метод может быть использован и для сравнения не обладающих структурным сходством ферментов с аналогичной функцией, возникшей независимо в ходе конвергентной эволюции. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке
Министерства образования и науки России
(госконтракт № 02.740.11.0866).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koonin E.V., Galperin M.Y. Sequence-Evolution-Function: Computational approaches in comparative genomics. Boston: Kluwer Academic, 2003. 488 p.
2. Holm L., Sander C. // *Science*. 1996. V. 273. № 5275. P. 595–603.
3. Grishin N.V. // *J. Mol. Evol.* 1997. V. 45. № 4. P. 359–369.
4. Ollis D.L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolof F., Franken S.M., Harel M., Remington S.J., Silman I., Schrag J., Sussman J.L., Verschueren K.H.G., Goldman A. // *Protein Engineering*. 1992. V. 5. P. 197–211.
5. Smith T.F., Waterman M.S. // *Adv. Appl. Math.* 1981. V. 2. P. 482–489.
6. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. № 3. P. 403–410.
7. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. № 17. P. 3389–3402.
8. Krissinel E., Henrick K. // *Acta Cryst.* 2004. V. D60. P. 2256–2268.
9. Dutta S., Zardecki C., Goodsell D.S., Berman H.M. // *J. Appl. Crystall.* 2010. V. 43. № 5. P. 1224–1229.
10. Suresh C.G., Pundle A.V., SivaRaman H., Rao K.N., Brannigan J.A., McVey C.E., Verma C.S., Dauter Z., Dodson E.J., Dodson G.G. // *Nat. Struct. Biol.* 1999. V. 6. № 5. P. 414–416.
11. Carita O., Rouvinen J. // *Protein Sci.* 2000. V. 9. P. 2329–2337.
12. Uppenberg J., Hansen M.T., Patkar S., Jones T.A. // *Curr. Biol.* 1994. V. 2. P. 293–398.
13. Gartler G., Kratky C., Gruber K. // *J. Biotechnol.* 2007. V. 129. № 1. P. 87–97.
14. Wallace A.C., Laskowski R.A., Thornton J.M. // *Protein Sci.* 1996. V. 5. № 6. P. 1001–1013.
15. Варфоломеев С.Д., Упоров И.В., Федоров Е.В. // *Биохимия*. 2002. Т. 67. № 10. С. 1328.
16. Morley K., Kazlauskas R.J. // *TRENDS Biotechnol.* 2005. V. 23. № 5. P. 231–237.
17. Notredame C., Higgins D., Heringa J. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 302. P. 205–217.
18. Konagurthu A., Whisstock J., Stuckey P., Lesk A. // *Proteins*. 2006. V. 64. P. 559–574.
19. The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.0r1. Schrödinger, LLC.
20. Waterhouse A., Procter J., Martin D., Clamp M., Barton G. // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. P. 1189–1191.
21. Valdar W.S.J., Thornton J.M. // *Proteins*. 2001. V. 42. P. 108–124.
22. Vingron M., Argos P. // *Comput. Appl. Biosci.* 1989. V. 5. P. 115–121.
23. Vinogradov D.V., Mironov A.A. // *Proc. 3rd Int. Conf. On Bioinformatics of Genome Regulation and Structure BGRS'2002*, 2002. Novosibirsk, Russia, July 1. P. 28–30.
24. Kalina O.V., Gelfand M.S., Russel R.B. // *BMC Bioinformatics*. 2009. V. 10. P. 174–198.
25. Porter C.T., Bartlett G.J., Thornton J.M. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. D129–D133.
26. Casari G., Sander C., Valencia A. // *Nat. Struct. Biol.* 1995. V. 2. P. 171–178.
27. Sankararaman S., Sha F., Kirsch J.F., Jordan M.I., Sjolander K. // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. № 5. P. 617–624.
28. Pazos F., Bang J.-W. // *Curr. Bioinformatics*. 2006. V. 1. P. 15–23.
29. Dundas J., Ouyang Z., Tseng J., Binkowski A., Turpaz Y., Liang J. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. W116–W118.
30. Liao D.-I., Breddam K., Sweet R.M., Bullock T., Remington S.J. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 9796–9812.
31. Gruber K., Garter G., Krammer B., Schwab H., Kratky C. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 19. P. 20501–20510.

УДК 581.5

Углеродные нанотрубки проникают в ткани и клетки и оказывают стимулирующее воздействие на проростки эспарцета *Onobrychis arenaria* (Kit.) Ser.

Е. А. Смирнова^{1*}, А. А. Гусев², О. Н. Зайцева², Е. М. Лазарева¹, Г. Е. Онищенко¹,
Е. В. Кузнецова³, А. Г. Ткачев⁴, А. В. Феофанов^{1,5}, М. П. Кирпичников^{1,5}

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

²Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, 392000, Тамбов, ул. Интернациональная, 33

³Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132

⁴ООО «НаноТехЦентр», 392000, Тамбов, ул. Советская, 51

⁵Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: kinggobi@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.02.2011 г.

РЕФЕРАТ Влияние промышленно производимых наноматериалов на окружающую среду требует детального изучения, так как использование, утилизация и непреднамеренные утечки неизбежно приводят к распространению и накоплению наночастиц в воздухе, почве и воде. Растения являются одним из основных компонентов экосистем, поэтому неизбежно их взаимодействие с наночастицами, загрязняющими окружающую среду. Цель данной работы состояла в изучении воздействия на растения промышленного наноматериала «Таунит» на основе многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ), а также определении его способности проникать в клетки и ткани растений. Установлено, что «Таунит» стимулирует рост надземных и подземных частей проростков и вызывает усиление активности пероксидаз у *Onobrychis arenaria*. Активность пероксидаз повышается при снижении концентрации «Таунита» в среде от 1000 до 100 мг/л. МУНТ из «Таунита» обнаружены в клетках и в межклеточном пространстве корней и листьев проростков, что указывает на способность МУНТ проникать в корни и накапливаться в них, а также транспортироваться по проводящей системе в листья проростков. Таким образом, изменения физиологических показателей растений связаны не только с адсорбцией МУНТ на корнях, как считалось ранее, но и с их проникновением в клетки и ткани растений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА многостенные углеродные нанотрубки, световая микроскопия, электронная микроскопия, дифракция электронов, проростки эспарцета.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ УНМ – углеродный наноматериал; МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки; ОУНТ – одностенные углеродные нанотрубки; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Преимущества использования наноматериалов в современных технологиях не вызывают сомнений. Однако возможные негативные эффекты, связанные с распространением и накоплением в окружающей среде таких компонентов наноматериалов, как наночастицы и нановолокна, требуют детального изучения [1, 2]. Растения – основной компонент экосистем,

поэтому изучению влияния на них разных техногенных наноматериалов уделяется большое внимание [3–5]. Повышенный интерес вызывают углеродные наноматериалы (УНМ), такие, как фуллерены, многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) и одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ), промышленное производство которых развивается быстрыми темпами. Так как нанотрубки имеют фибриллярную

форму, их часто сравнивают с асбестом [6] и по аналогии с ним опасаются возможного неблагоприятного воздействия на живые организмы [7]. Предварительные исследования дают основания полагать, что МУНТ/ОУНТ патогенны для животных [8]. В то же время нанотрубки по-разному влияют на растения. Показано, что МУНТ значительно усиливают скорость прорастания семян томатов [9], не влияют на параметры роста проростков пшеницы [10] и подавляют рост проростков риса [11], а ОУНТ подавляют рост корней томата, но стимулируют рост корней у лука и огурца [12]. МУНТ оказывают токсическое действие и на культивируемые клетки *Arabidopsis* [13]. Во всех исследованиях отмечали высокую адсорбцию МУНТ/ОУНТ на поверхности корневой системы проростков. Открытым остается вопрос о способности МУНТ/ОУНТ проникать и накапливаться в клетках и тканях растений. При этом неясен механизм развития физиологических эффектов, вызываемых экзогенным воздействием нанотрубок на растения. Цель работы – изучение воздействия промышленного наноматериала «Таунит» на основе МУНТ на проростки эспарцета и способности МУНТ проникать в клетки и ткани растений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования

Объект данного исследования – промышленный УНМ «Таунит» (ООО «НаноТехЦентр», Тамбов, Россия). Этот материал представляет собой сыпучий порошок черного цвета. Гранулы порошка размером в несколько микрометров состоят из спутанных пучков МУНТ. МУНТ имеют структуру полых цилиндров длиной 2 мкм и более, с наружным диаметром 20–70 нм и внутренним диаметром 5–10 нм. «Таунит» получают путем газофазного химического осаждения, его чистота составляет более 98% [14].

Проращивание семян и морфометрическая оценка

Семена эспарцета песчаного *Onobrychis arenaria* (Kit.) Ser. проращивали в среде, содержащей коллоидный водный раствор УНМ «Таунит» в концентрации 100 или 1000 мг/л. Перед использованием УНМ диспергировали в дистиллированной воде при помощи ультразвуковой установки. Для приготовления контрольной среды брали дистиллированную воду. Семена (50 штук на чашку) проращивали в течение 10 дней на фильтровальной бумаге в стеклянных чашках Петри диаметром 90 мм, в которые добавляли 5 мл суспензии УНМ. Размер выборки – 200 семян в каждом опыте. Условия проращивания соответствовали требованиям методики ГОСТа 12038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы

определения всхожести». Воздействие УНМ оценивали по следующим параметрам: всхожесть семян (%), энергия прорастания (%), линейные размеры надземных и подземных частей растений. Энергию прорастания и всхожесть определяли как отношение числа проросших семян к числу высеванных в процентах на 5-е и на 10-е сут соответственно (согласно ГОСТу).

Экстракция растворимых (общих) пероксидаз и определение их активности

Навески (2 г) тканей проростков эспарцета помещали в 5 мл холодного цитратно-фосфатного буфера (1 М раствор лимонной кислоты + 1 М NaH_2PO_4 , два раствора сливают вместе до pH 5.5) и растирали в фарфоровой ступке при 4°C [15]. Гомогенат центрифугировали при 3000g в течение 15 мин. Супернатант использовали для определения активности растворимых пероксидаз по скорости изменения (времени в секундах) оптической плотности при длине волны 580 нм в реакционной смеси следующего состава: 0.5 мл 0.1 М раствора цитратно-фосфатного буфера (pH 5.5), 0.5 мл 0.3% H_2O_2 («Реахим», Россия), 0.5 мл 0.05% гваякола («Sigma», США) и 0.5 мл пробы. Активность пероксидаз определяли при 25°C сразу после выделения ферментов из образцов. Активность рассчитывали по методу Бояркина [16] и выражали в условных единицах активности на грамм сырой массы тканей в секунду по формуле:

$$A = (\varepsilon \times \alpha \times \beta \times \gamma) / (d \times t),$$

где ε – коэффициент экстинкции;
 α – отношение количества буфера, взятого для приготовления вытяжки (мл), к массе сырой ткани (г);
 β – степень дополнительного разведения вытяжки в реакционной смеси;
 γ – степень постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси;
 d – толщина поглощающего слоя (мм);
 t – время реакции (с).

Подготовка проб для микроскопии

Дно пластиковой коробки (размеры коробки приблизительно 40 × 40 × 7 см) выстилали четырьмя слоями марли, смачивали ее раствором УНМ или водой (в контроле). На марле раскладывали по 100 семян эспарцета. Концентрация УНМ – 300 мг/л.

Проростки отбирали на 5-й и 10-й день и подвергали фиксации для анализа методами световой и электронной микроскопии. Для световой микроскопии проростки фиксировали в смеси 96% этанола и уксусной кислоты (3 : 1) в течение 16 ч. После фиксации образцы растений переносили в 70% этанол.

Затем исследуемые участки растений (корень, лист, колеоптиль) помещали на предметное стекло в каплю 45% уксусной кислоты. Приготовление тотальных препаратов различных органов растений проводили по стандартному методу [17]. Готовые препараты анализировали с помощью светового микроскопа Leica DM1000 (объективы $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$ и $\times 100$), а изображения регистрировали цифровой камерой Leica DFC 295 (размер сенсора 3×10^6 пикселей).

Для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) проростки фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом на 0.1 М Na-K-фосфатном буфере (pH 7.2) с добавлением сахарозы (15 мг/мл). Затем проводили дегидратацию проб в серии этанола возрастающей концентрации и заключали в эпон 812 по стандартной методике. Чтобы облегчить выявление углеродных нанотрубок на фоне тканевых структур, мы отказались от дополнительной фиксации образцов с OsO_4 , а также от контрастирования уранилацетатом и PbNO_3 .

Образец исходного УНМ готовили для ПЭМ следующим образом: 25 мг «Таунита» помещали на поверхность жидкой смолы (эпон 812), налитой в пробирку, центрифугировали в течение 3 мин при 6000 г и полимеризовали по стандартной методике.

Ультратонкие срезы залитых в эпон образцов исследовали методами ПЭМ и дифракции электронов с помощью просвечивающих электронных микроскопов JEM-1011 (JEOL) с цифровой фотокамерой GATAN ES500W и LEO 912AB (Carl Zeiss).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние «Таунита» на морфометрические и биохимические характеристики проростков эспарцета

Для определения экотоксичности УНМ использовали тест на прорастание семян, в котором оценивали всхожесть, длину корней и стеблей, энергию прорастания и активность пероксидаз [18]. Проращивание семян эспарцета песчаного в присутствии коллоидного раствора УНМ «Таунит» увеличило энергию прорастания на 14% по сравнению с контролем. УНМ в концентрации 100 и 1000 мг/л повышал всхожесть семян на 2 и 7% соответственно (рис. 1а). «Таунит» усиливал рост подземных и надземных частей растений. При концентрации УНМ, равной 100 и 1000 мг/л, увеличение длины корней составило 55 и 73% соответственно, а стеблей проростков – 84 и 82% по сравнению с контролем (рис. 1б). Таким образом, УНМ «Таунит» вызывает небольшое повышение всхожести семян и энергии их прорастания, а также значительно усиливает рост надземных и подземных частей растения. В концентрации 100 и 1000 мг/л «Таунит» усиливал активность пероксидаз в про-

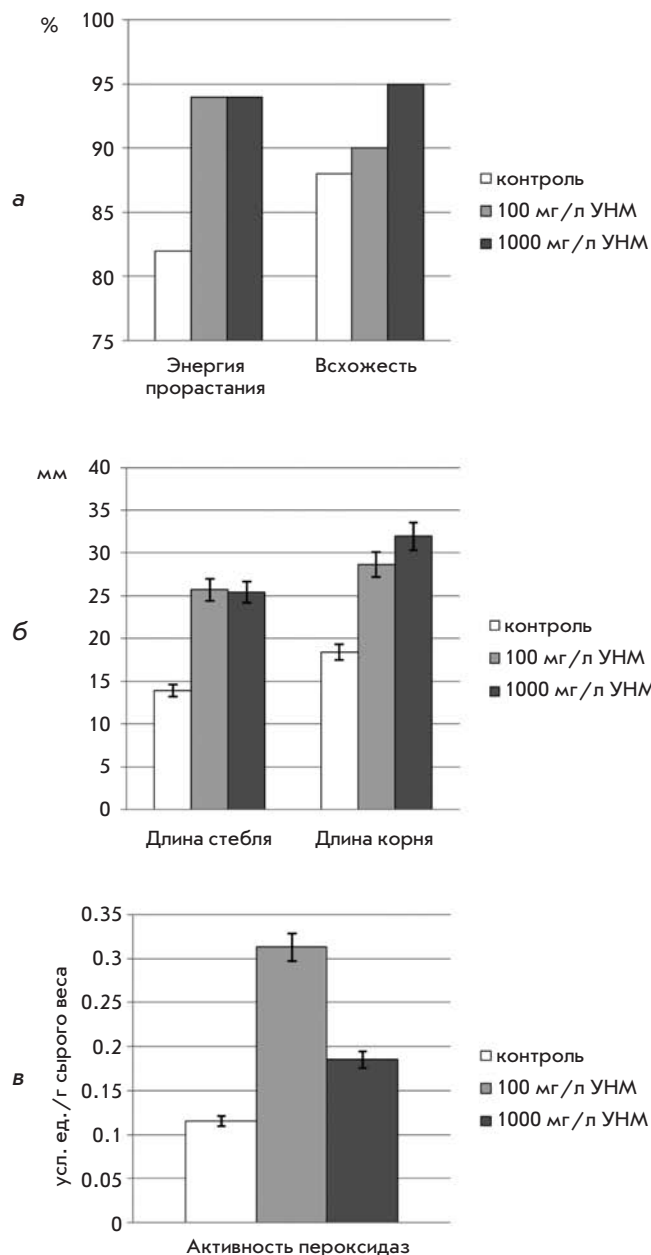


Рис. 1. Влияние различных концентраций углеродного наноматериала (УНМ) на витальные, морфометрические и биохимические характеристики проростков семян эспарцета.

ростках эспарцета, соответственно, до 0.31 ± 0.01 и 0.19 ± 0.02 усл. ед. /г сырого веса, что достоверно больше контрольного значения (0.12 ± 0.01) (рис. 1в).

Известно, что растения отвечают на механические воздействия и повреждения путем изменения морфологии или скорости роста. Это явление получило название тигмоморфогенеза. Тигмоморфогенетические

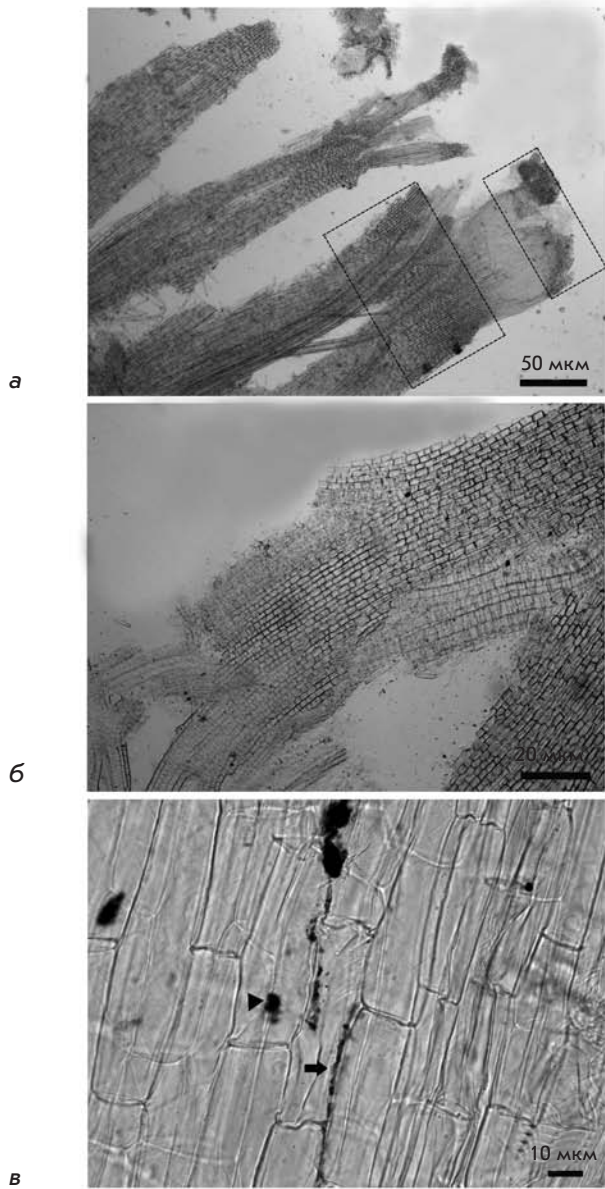


Рис. 2. Препарат распластанного корня эспарцета. Дополнительное контрастирование (окрашивание) не проводилось. *а* – В корне УНМ распределяется неравномерно, и области более интенсивного накопления выделены прямоугольными вставками. УНМ декорируют межклетники чехлика, зоны дифференцировки и проводящие пучки. Масштаб 50 мкм. *б* – Включение УНМ в межклетники зоны дифференцировки. Масштаб 20 мкм. *в* – Крупные скопления УНМ локализованы в межклетниках (стрелка) и клетках (треугольная стрелка). Масштаб 10 мкм.

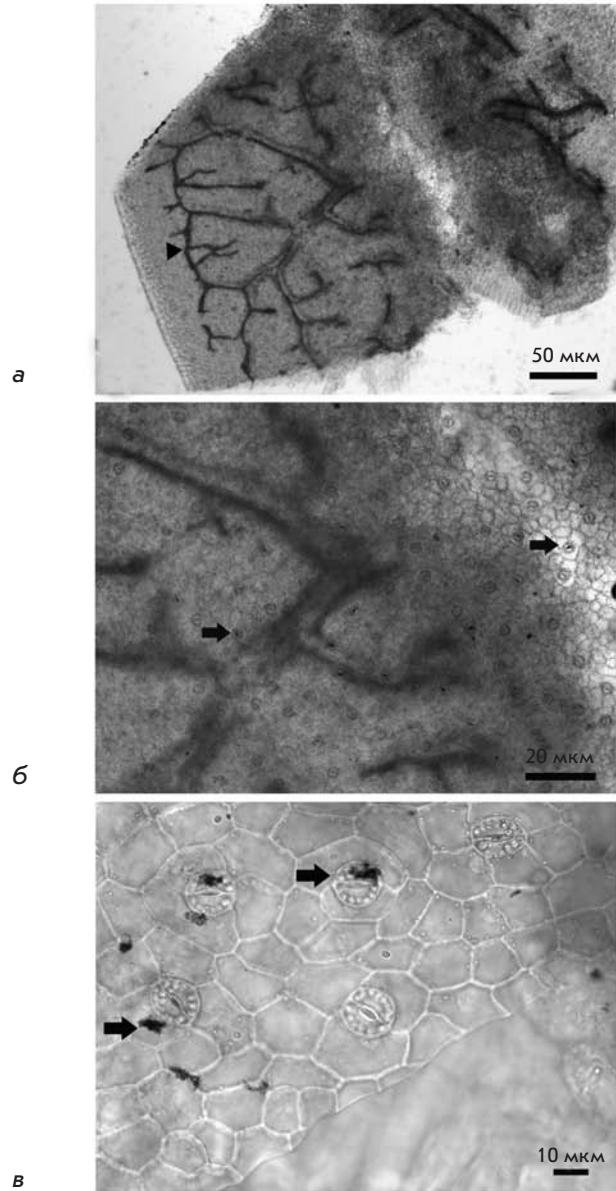


Рис. 3. Препарат распластанного участка листа эспарцета. Дополнительное контрастирование (окрашивание) не проводилось. *а* – УНМ декорируют проводящие пучки (треугольная стрелка). Масштаб 50 мкм. *б* – УНМ окрашивает проводящие пучки и локализуется в устьицах (стрелки). Масштаб 20 мкм. *в* – УНМ выявляется в замыкающих клетках устьица и в клетках эпидермиса (стрелки). Масштаб 10 мкм.

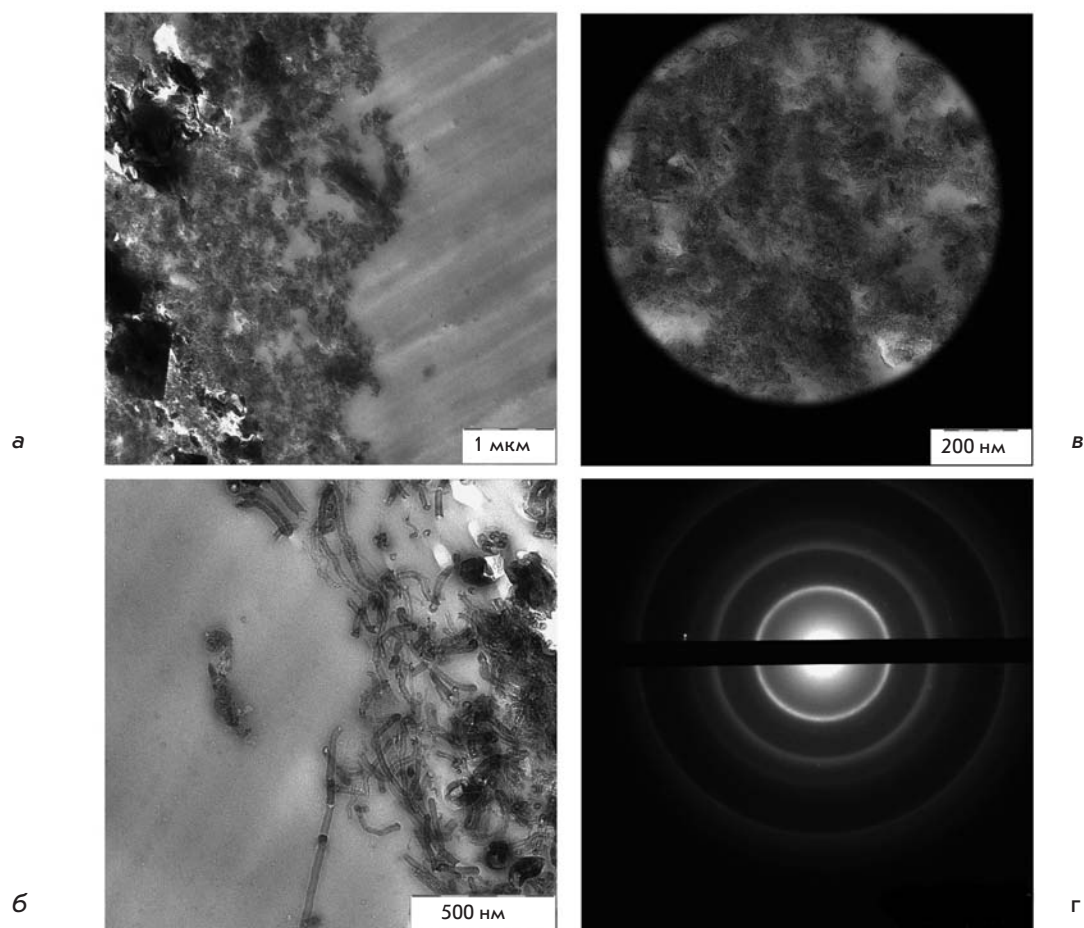


Рис. 4. Электронно-микроскопический анализ образцов УНМ «Таунит». а, б – Ультратонкий срез образца УНМ. в – Участок среза, выбранный для анализа с помощью дифракции электронов. г – Электронограмма анализируемой области.

изменения рассматривают как процесс адаптации растений к стрессовым ситуациям, и важную роль в этом играют растительные гормоны [19]. При механическом стрессе повышается активность гормона «стресса» растений – жасмоновой кислоты, и понижается активность ауксина, который контролирует процессы морфогенеза и роста растений, и причиной этого является усиление активности пероксидаз [20–22]. Пероксидаза принимает участие в целом ряде биологических процессов, таких, как фотосинтез, дыхание, белковый обмен. Это один из антиоксидантных ферментов, обладающий повышенной чувствительностью к внешним воздействиям, что позволяет использовать активности пероксидаз в качестве тестовой характеристики для определения состояния растения. В большинстве случаев повышение активности пероксидаз свидетельствует о включении механизма неспецифического ответа растения на стресс [23]. Можно предположить, что повышение активности пероксидаз связано с окислительным стрессом, вызванным УНМ. В связи с тем, что взаимодействие МУНТ с корнями растений сопровождается нарушением целостности покровных тканей [10] и усилением

активности пероксидаз, такое взаимодействие можно рассматривать как механическое повреждение. По результатам нашего исследования установлено, что уровень активности пероксидаз снижается при повышении концентрации УНМ в исследованном диапазоне. Возможной причиной этого может быть инактивация нанотрубками молекул пероксидаз за счет сорбционных или других химических взаимодействий. Наши исследования показали, что наряду с повышением уровня активности пероксидаз удлиняются подземные и надземные части растений. Для установления причины усиленного роста растений, выращиваемых в присутствии УНМ, требуются дальнейшие исследования.

Анализ взаимодействий УНМ «Таунит» с проростками эспарцета методами микроскопии

При проращивании эспарцета в присутствии УНМ «Таунит» корни, стебли и листья проростков приобретают характерный темно-серый цвет. Анализ тотальных препаратов проростков показал, что конгломераты темно-серого и черного цвета локализируются как на поверхности корней проростков, так и в опре-

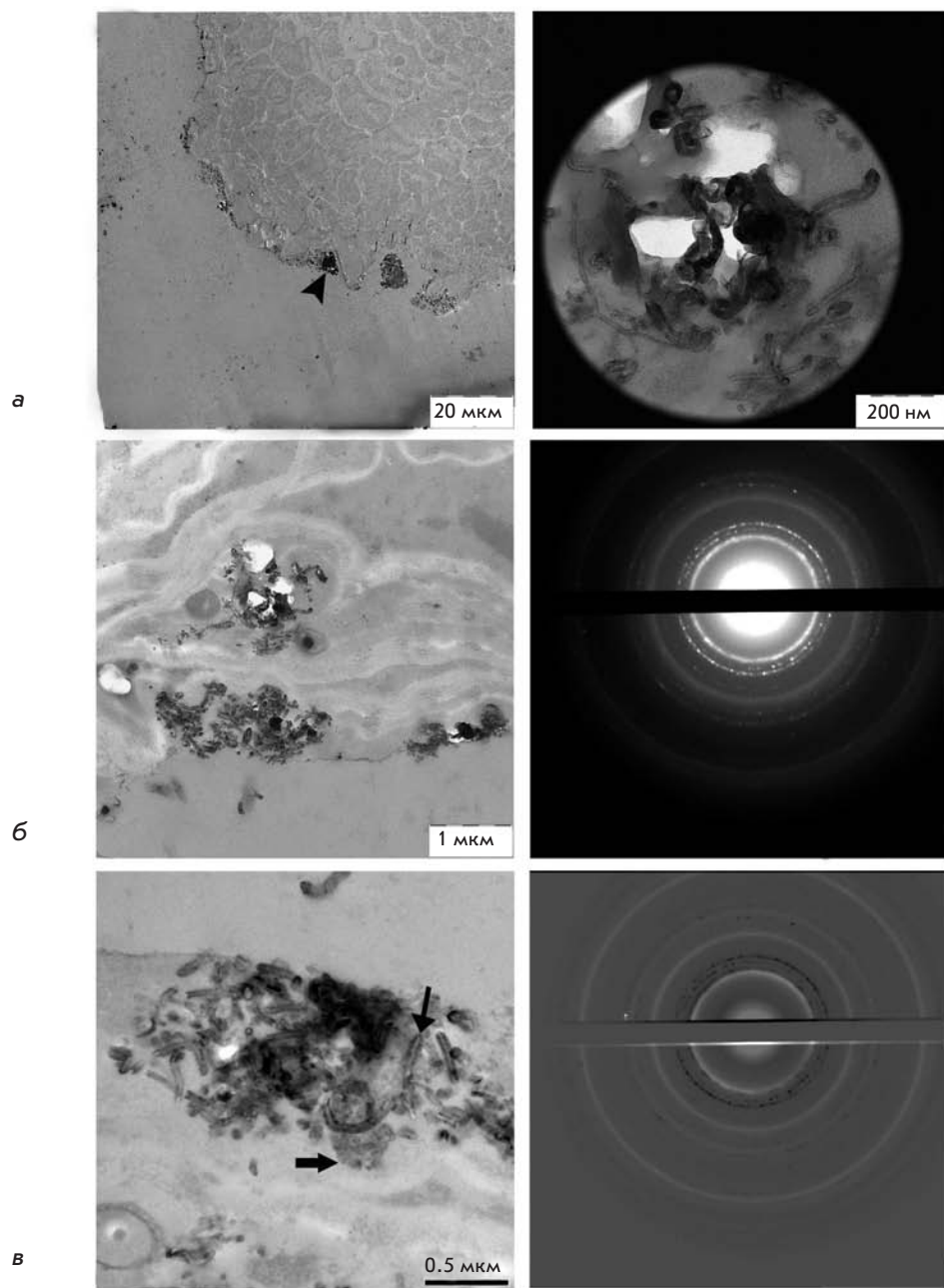


Рис. 5. Электронно-микроскопический анализ ультратонких срезов корня эспарцета после инкубации с УНМ. а – На поверхности корня присутствуют скопления УНМ, одно из них показано стрелкой. б – Скопления УНМ на поверхности и в клетках корня. в – Скопления УНМ в клетках состоят из нанотрубок (тонкая стрелка) и мелкодисперсного электронно-плотного материала (толстая стрелка). г – Участок корня, содержащий УНМ и выбранный для анализа с помощью дифракции электронов. д – Электронограмма анализируемой области. е – Совмещение электронограммы эталона УНМ (рис. 4г) и инвертированного изображения электронограммы УНМ в клетке корня проростка (5д). Совпадающие рефлексы и кольца на этой электронограмме – белые; рефлексы, отсутствующие на электронограмме эталона УНМ, – черные.

деленных внутренних зонах корней, стеблей и листьев, содержатся в клетках и межклеточном пространстве (рис. 2а–в, 3а–в). Ультратонкие срезы, приготовленные из участков органов растений, которые по данным световой микроскопии аккумулировали черные конгломераты, дополнительно исследовали методами электронной микроскопии.

Предварительно был проведен анализ исходного УНМ. На изображениях видна характерная структура УНМ «Таунит» (рис. 4а,б) – конгломераты МУНТ и включения нанодисперсного электронно-плотного материала, вероятно, графитизированного углерода.

Морфологические особенности МУНТ хорошо видны на рис. 4б. Участок с МУНТ, не содержащий графитизированного углерода (рис. 4в), был охарактеризован методом дифракции электронов. Как показано на рис. 4г, МУНТ, благодаря упорядоченной периодической упаковке атомов углерода, формируют на электронограмме кольца, характерные для поликристаллических образцов. Данную электронограмму мы использовали в качестве эталонной для идентификации МУНТ в биологических образцах.

Анализ ультратонких срезов корней и листьев проростков показал, что УНМ находятся как на поверх-

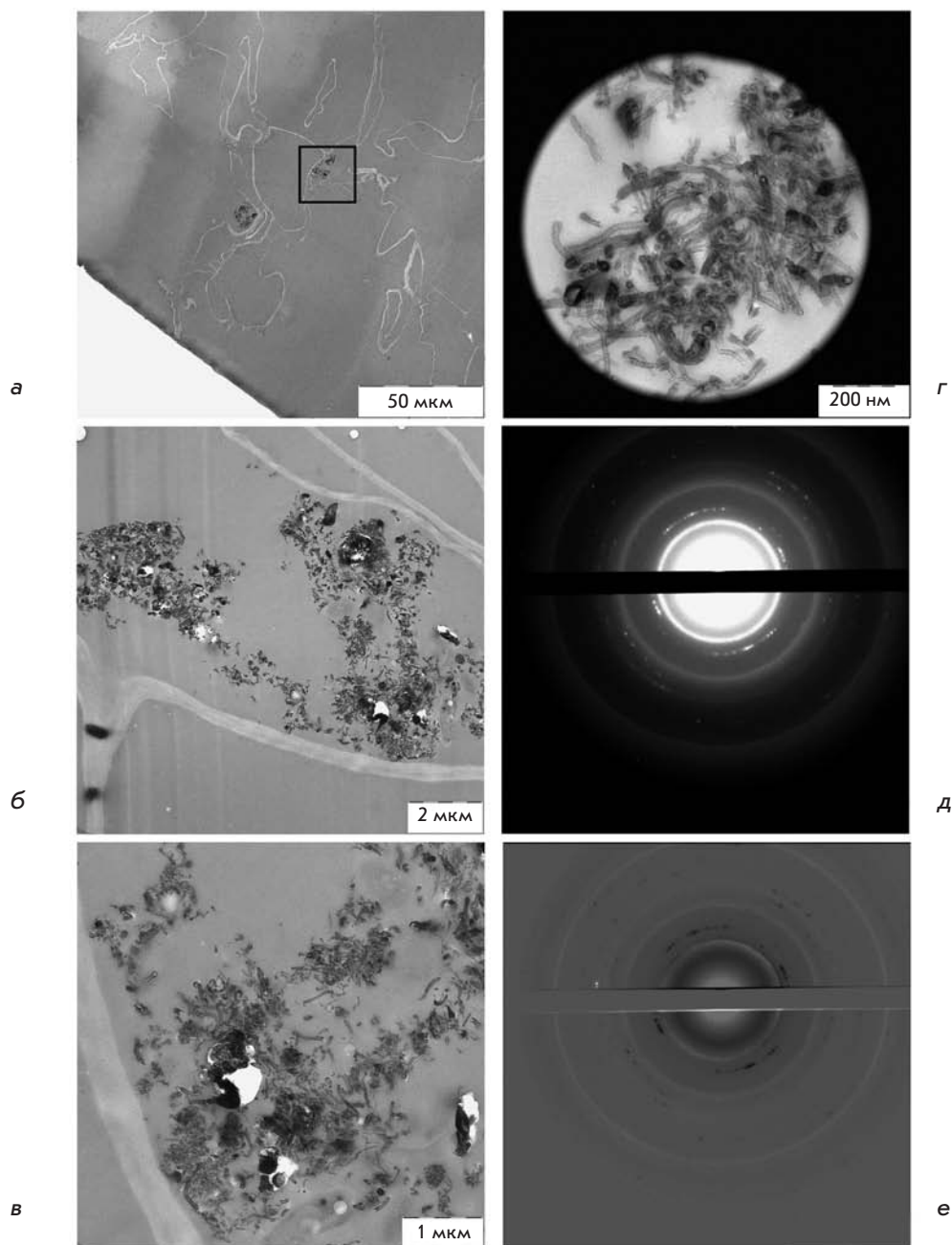


Рис. 6. Электронно-микроскопический анализ ультратонких срезов листа эспарцета после инкубации с УНМ. а – Участок листа с двумя скоплениями УНМ в клетках. Участок, выделенный в прямоугольной рамке, показан на большем увеличении на б и в. б, в – УНМ состоит из нанотрубок и мелкодисперсного электронно-плотного материала. г – Участок листа, выбранный для анализа с помощью дифракции электронов. д – Электронограмма анализируемой области. е – Совмещение электронограмм образца (рис. 4г) и инвертированного изображения электронограммы УНМ в клетке листа проростка (бд). Совпадающие рефлексы и кольца на этой электронограмме – белые; рефлексы, отсутствующие на электронограмме эталона УНМ, – черные.

ности, так и внутри органов проростков. Адсорбция МУНТ на поверхности корешка (рис. 5а) согласуется с данными других исследователей [3, 10, 11]. При этом скопления и одиночные МУНТ разной длины обнаруживаются также в клетках корня (рис. 5б,в) и листа (рис. 6а–в). Нанотрубки, лежащие в плоскости среза, четко распознаются с помощью ПЭМ по характерным морфологическим особенностям. Однако, если МУНТ расположены поперек или под большим углом к плоскости среза, то остающиеся в срезе фрагменты МУНТ трудно отличить от различных электронно-

плотных эндогенных включений. В этих случаях для идентификации МУНТ в тканях растений можно использовать метод дифракции электронов (рис. 5г, 6г). При наложении электронограмм видно, что все дифракционные кольца на электронограмме биологических образцов (рис. 5д, 6д) совпадают с кольцами на электронограмме эталона (рис. 4г), что также подтверждает присутствие МУНТ в клетках растений. Отдельные дополнительные рефлексы на электронограммах объясняются наличием в тканях растений эндогенных кристаллических включений.

Накопление МУНТ на поверхности корней отмечают многие исследователи [3, 9–11], и с этим связывают влияние данного наноматериала на рост и развитие растений [13]. Подавление роста растений объясняют блокированием всасывания воды и питательных веществ из-за адсорбции большого количества МУНТ на поверхности корней [11]. Усиление всхожести семян связывают с тем, что нанотрубки, в частности ОУНТ, протыкают семенную кожуру и увеличивают поступление воды, способствующей прорастанию семян и росту растений [9]. Однако ОУНТ не только протыкают клеточную стенку, но и проникают внутрь клеток, что показано с помощью ОУНТ, меченных FITC (SWNT/FITC) [24]. МУНТ, проникающие сквозь клеточную стенку клеток эпидермиса и корневых волосков на глубину до 4 мкм, наблюдали в проростках пшеницы с помощью двухфотонной микроскопии, но полного проникновения МУНТ в цитоплазму не обнаружили [10]. Авторы предположили, что внутриклеточное накопление МУНТ затруднено из-за большего по сравнению с ОУНТ диаметра нанотрубок [10].

ВЫВОДЫ

Нами впервые на примере эспарцета показано, что МУНТ способны проникать через клеточную стенку, накапливаться в клетках и межклеточном пространстве, и поступать по проводящим системам из корней в стебли и листья растений. Не исключено, что наблюдавшиеся нами усиление роста корней и стеблей эспарцета, а также повышение активности пероксидаз вызваны окислительным стрессом, который развивается из-за накопления МУНТ в клетках и тканях растений. ●

Авторы выражают глубокую благодарность за помощь в выполнении работы С.С. Абрамчуку (Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского).

Работа была поддержана ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (госконтракты П 208 от 23.04.2010 г. и 16.740.11.01-94 от 24.09.2010) и Государственным контрактом № 01.648.11.3003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Handy R.D., Owen R., Valsami-Jones E. // *Ecotoxicology*. 2008. V. 17. P. 315–325.
- Moore M.N. // *Environ. Internat.* 2006. V. 32. P. 967–976.
- Ma X., Geiser-Lee J., Deng Y., Kolmakov A. // *Sci. Total Environ.* 2010. V. 408. P. 3053–3061.
- Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N.I.B., Filser J., Miao A.-J., Quigg A., Santschi P.H., Sigg R. // *Ecotoxicology*. 2008. V. 17. P. 372–386.
- Ruffini Castiglione M., Cremonini R. // *Cariologia*. 2009. V. 62. P. 161–165.
- Berhanu D., Dybowska A., Misra S.K., Stanley C.J., Ruenraroengsak P., Voccaccini A.R., Tetley T.D., Luoma S.N., Plant J.A., Valsami-Jones E. // *Environ. Hlth.* 2009. V. 8 (Suppl 1). S3.
- Yuliang Zh., Genmei Xi., Zhifang Ch. // *Nat. Nanotechnol.* 2008. V. 4. P. 191–192.
- Poland C.A., Duffin R., Kinloch I., Maynard A., Wallace W. A., Seaton A., Stone V., Brown S., MacNee W., Donaldson K. // *Nat. Nanotechnol.* 2008. V. 3. P. 423–428.
- Khodakovskaya M., Dervishi E., Mahmood M., Xu Y., Li Z., Watanabe F., Biris A.S. // *ACS Nano*. 2009. V. 3. P. 3221–3227.
- Wild E., Jones K.C. // *Environ. Sci. Technol.* 2009. V. 43. P. 5290–5294.
- Lin S., Reppert J., Hu Q., Hudson J.S., Reid M.L., Ratnikova T.A., Rao A.M., Luo H., Ke P.C. // *Small*. 2009. V. 5. P. 1128–1132.
- Canas J.E., Long M., Nations S., Vadan R., Dai L., Luo M., Ambikapathi R., Lee E.H., Olszyk D. // *Environ. Toxicol. Chem.* 2008. V. 27. P. 1922–1931.
- Lin C., Fugetsu B., Su Y., Watari F. // *J. Hazardous Material*. 2009. V. 170. P. 578–583.
- Ткачев А.Г., Золотухин И.В. Аппаратура и методы синтеза твердотельных наноструктур. М.: Машиностроение-1, 2007. 316 с.
- Паду Э.Х. // *Физиология растений*. 1995. Т. 42. № 3. С. 408–415.
- Бояркин А.Н. // *Биохимия*. 1951. Т. 16. № 4. С. 352–355.
- Паушева Э.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1974. 288 с.
- Barrena R., Casals E., Colón J., Font X., Sánchez A., Puentes V. // *Chemosphere*. 2009. V. 75. P. 850–857.
- Chehab E.W., Eich E., Braam J. // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 43–56.
- Hofinger M., Chapelle B., Boyer N., Gaspar T. // *Plant Physiol.* 1979. V. 63. S-52.
- Ostin A., Kowalczyk M., Bhalerao R.P., Sandberg G. // *Plant Physiol.* 1998. V. 118. P. 285–296.
- Woodward A.W., Bartel B. // *Ann. Botany*. 2005. V. 95. P. 707–735.
- Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988. 128 с.
- Liu Q., Chen B., Wang Q., Shi X., Xiao Z., Lin J. Fang X. // *Nano Lett.* 2009. V. 9. P. 1007–1010.

УДК 57.089.61

Моделирование инфаркта миокарда на мышах: методология, мониторинг, патоморфология

А. А. Овсебян⁴, Д. Н. Панченков^{1,3}, Е. Б. Прохорчук^{1*}, Г. Б. Телегин⁴, Н. А. Жигалова¹,
Е. П. Голубев², Т. Е. Свиридова⁵, С. Т. Мацкеплишвили², К. Г. Скрябин¹, Ю. И. Бузиашвили^{1,2}

¹Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1

²Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН, 121552, Москва, Рублевское шоссе, 135

³Московский государственный медико-стоматологический университет, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20/1

⁴Филиал Учреждения Российской академии наук Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ФИБХ), 142290, Пушкино, Московская обл., просп. Науки, 6

⁵Дорожная клиническая больница им. Н.А. Семашко ОАО «РЖД», 129128, Москва, ул. Будаيسкая, 2

*E-mail: prokhortchouk@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 12.11.2010 г.

РЕФЕРАТ Инфаркт миокарда – одно из тяжелых и распространенных заболеваний в мире. Впервые в России разработан минимально инвазивный метод моделирования инфаркта миокарда у мышей с помощью лигирования коронарной артерии сердца или контролируемой электрокоагуляции. Налажен комплекс анестезиологических, микрохирургических и реанимационных мероприятий, достигнуто снижение послеоперационной летальности животных с 94.6 до 13.6%. Регистрация электрокардиограммы позволила диагностировать развитие крупноочагового или поверхностного инфаркта миокарда. В результате гистологических исследований очаги некроза выявлены в сердечной мышце 87.5% мышей. Диагностические данные позволяют говорить о возможности создания адекватной модели инфаркта миокарда на лабораторных мышах. Дальнейшая отработка и стандартизация экспериментального инфаркта миокарда позволит применять данную модель к геномодифицированным линиям мышей, что важно для поиска эффективных способов лечения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА инфаркт миокарда, коронарная артерия, лигирование, контролируемая электрокоагуляция.

ВВЕДЕНИЕ

Важность моделирования инфаркта миокарда на животных, в первую очередь, обусловлена необходимостью изыскания и отработки оптимальных схем лечения этого заболевания с использованием новых подходов, включая фармакологическую и клеточную терапию. В силу гетерогенности понятия «инфаркт миокарда» у человека, множественных его проявлений, которые, возможно, отмечаются на отягощенном другой патологией фоне, например на фоне сахарного диабета или повышенного уровня содержания холестерина в крови, возникает вопрос – каким же образом создавать животные модели, отражающие

всю сложность этиологии этого заболевания? Общая идеология, положенная в основу выбора объекта для биомоделирования, должна удовлетворять следующим условиям: 1) удобство проведения операций на открытом сердце животного; 2) возможность использования геномодифицированных или селекционно выведенных линий животных с заданными особенностями моделируемого инфаркта; 3) возможность последующей стандартизации и сертификации на соответствие международным требованиям как самой технологии, так и лаборатории, в которой получают биомодели. Первые два условия находятся между собой в определенном конфликте, поскольку

обычно пригодность организмов для генетических исследований связана с их большой численностью и соответственно с маленькими размерами (классические генетические объекты – *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*), и это является очевидным ограничением на проведение хирургического вмешательства. Последнее же условие диктует необходимость получения модельных животных в количествах, достаточных для статистически достоверного проведения первой фазы доклинических испытаний новых фармацевтических препаратов или проведения клеточной терапии. С одной стороны, это вопрос надежности протокола хирургического вмешательства и послеоперационных восстановительных процедур, позволяющих повысить выживаемость животных, что, в свою очередь, масштабирует процесс получения биомоделей, а с другой – вопрос наличия в Российской Федерации сертифицированных мощностей и аппаратной базы для соответствующего рода работ. Находясь в своеобразных «ножницах» между размером животного и доступностью его генетических линий, исследователь так или иначе идет на компромиссы, которые могут отразиться на качестве проведения доклинических испытаний.

Для моделирования инфаркта нами были выбраны лабораторные мыши. Работа с этими животными налажена в Научно-производственном подразделении «Питомник лабораторных животных» ФИБХ, имеющем международную аккредитацию. Таким образом, в случае разработки и сертификации технологии согласно требованиям, предъявляемым Международной организацией по стандартизации (ISO), появится возможность не только использовать биомодели в фундаментальных научных исследованиях, но и поставлять их фармацевтическим компаниям в России и за ее пределами, поскольку проведение доклинических испытаний возможно только на стандартизованных модельных животных с особым статусом здоровья (обычно это SPF – Specified Pathogen Free животные), который как раз и поддерживается в питомнике ФИБХ. Основное преимущество мышей – развитая сеть их генетических ресурсов, острый недостаток которых наблюдается, к примеру, у родственных им крыс. При этом генетическое разнообразие инбредных линий мышей позволяет выделить животных, пригодных для исследования сердечно-сосудистых заболеваний. В частности, линии A/J и C3H/HeJ устойчивы к повреждению аорты при атеросклерозе, развивающемся при поддержании животных на атерогенной диете (1.25% холестерина, 0.5% холевая кислота и 15% жир), что отличает их от крайне чувствительных к атерогенной диете линий C57BL/6J и от частично устойчивых SWA/J [1–3]. У крыс также есть инбредные линии, которые

потенциально могут подойти для моделирования инфаркта (в этой связи стоит упомянуть популярную модель крыс SHR с повышенным артериальным давлением) [4]. Основное преимущество мышинных моделей состоит в возможности манипулирования с геномом мышинных эмбриональных стволовых клеток при очень слабой развитости такого рода технологий для крысиных клеток. Технологии трансгенеза, нокаута (knock-out) и нокина (knock-in) – как тканеспецифических, так и индуцибельных – дают возможность удалять, вставлять, а иногда и просто делать точечные замены в генах мышей.

Выбор генов всегда остается за исследователем, а многообразие такого выбора открывает удивительные перспективы для создания различных генетических аномалий, которые могут послужить фоном для самой модели инфаркта. Таким образом, технологию микрохирургического моделирования инфаркта можно применить к любой доступной генетической модели. Например, если нужно получить модель инфаркта на фоне повышенного уровня холестерина, то необходимо использовать мышшь с нарушенным геном аполиipoproteина 4E (*apoE4*), если же важно получить инфаркт на фоне кардиомиопатии, то необходимо использовать мышшь BALB/c или CD-1. В каталоге Джексоновской лаборатории (США) в разделе моделей для сердечно-сосудистых заболеваний числятся 373 линии, 20 из которых – селекционно выведенные инбредные линии, а остальные получены за счет генетических манипуляций более чем с 50 генами. Среди генетических моделей заболеваний, к которым потенциально возможно применить технологию микрохирургического моделирования инфаркта, можно упомянуть следующие: гипо- и гипертония, атеросклероз, кардиомиопатия, повреждение коронарных сосудов, различные метаболические синдромы, ишемия, гипо- и гиперхолестеринемия, гипо- и гипертриглицеридемия. Комбинация моделированного микрохирургическим путем инфаркта с генетическими моделями создает предпосылки для воспроизведения самых различных заболеваний сердца человека в мышях и последующего использования этих животных для клинических испытаний лекарственных препаратов и клеточной терапии. В последнем случае появляется возможность наблюдать за судьбой инъецированных в сердце (или сосуды) клеток, в которые введены различного рода флуоресцентные метки (например, зеленый флуоресцентный белок, GFP) или радиоактивные метки (мечение клеток изотопами). Вводимый клеточный материал не будет отторгаться у гомозиготных животных, места его интеграции можно будет без труда определять с помощью многосрезовой томографии, проводя тем самым прижизненный мониторинг эф-

фективности клеточной терапии. К очевидным недостаткам мышей относятся малый размер их внутренних органов и объем циркулирующей крови. Ныне существующие методики создания таких биомоделей на мышах сопровождаются высокой (до 90%) летальностью лабораторных животных [5–9], обусловленной высокой хирургической агрессией и большой кровопотерей [10–13]. Поэтому для успешного выполнения вмешательства необходимо наладить целый комплекс анестезиологических, микрохирургических и реанимационных мероприятий – интубацию трахеи мыши для вентиляции легких аппаратом ИВЛ, ингаляционный наркоз, бескровную торакотомию, лигирование левой нисходящей коронарной артерии, процедуры по восстановлению животных после хирургической модификации, снятие электрокардиограммы (ЭКГ), которые по методологии и техническому оснащению существенно отличаются от уже проводимых в России операций на крысах.

Цель настоящей работы – разработка, впервые в России, минимально инвазивной методики моделирования инфаркта миокарда у лабораторных мышей с комплексом послеоперационных мероприятий, направленных на реабилитацию оперированных животных и мониторинг их состояния в послеоперационном периоде.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Предоперационный период и наркотизация

В работе использовали 48 мышей стока CD-1, пол смешанный, старше 8 недель, вес 32 – 36 г. За 24 ч до операции животных пересаживали в клетки с чистой подстилкой и водой. Из кормушек полностью убрали корм. Непосредственно перед операцией животных взвешивали и рассчитывали объем анестезирующих средств. Для обезболивания применяли инъекционный, смешанный золетил/ксилазиновый наркоз (золетил (тайлетамин+золазепам) 40–50 мг/кг, ксилазин 15–20 мг/кг живого веса животного). После хирургического наркоза и перед интубацией легких для нервно-мышечной релаксации при необходимости использовали официальный препарат ветранквил 1% (Ceva Sante Animale, Франция), содержащий ацепромазин 1% и хлоробутанол 0.5%, в дозе 2–4 мг/кг ацепромазина и 1–2 мг/кг хлоробутанола. Также для предотвращения высыхания роговицы у наркотизированного животного до начала хирургического вмешательства на глаза наносили гель Normlgel – 0.9% (Mölnlycke Health Care). Подготовку операционного поля осуществляли в области грудной клетки с левой стороны: шерсть выбривали, кожу обрабатывали дезинфицирующим раствором Декосепт (BORER CHEMIE AG, Швейцария) и дра-

Вес мыши, г	Порционный объем, мкл	Кратность подаваемого воздуха в минуту
22–27	175	130
28–35	200	120
35 и более	225	110

пировали стерильной адгезивной самоклеющейся пленкой Op-Site (Smith&Nephew, Англия) (рис. 1а). У всех животных сразу после наркотизации проводили ЭКГ (методика описана ниже). Для интубации легких мышей фиксировали в спинном положении на подогреваемом операционном столике. Интубационной трубкой (размер трубки – наружный диаметр 1–1.2 мм, внутренний диаметр 0.6–0.8 мм, длина 25–30 мм) производилась интубация трахеи (рис. 1б). К интубационной трубке подключали аппарат искусственной вентиляции легких MiniVent Ventilator for Mice (HSE Harvard, Германия (рис. 1в) с параметрами вентиляции – 30% инспираторной концентрации кислорода (генерируют с помощью медицинского кислородного концентратора серии «NewLife» (AirSep, США)). Расчетные величины объема и кратности подаваемого воздуха приведены в таблице.

Оперативный прием

Под контролем операционного стереомикроскопа (Leica MZ7.5, увеличение 10–25-кратное, рабочее расстояние 25–30 см) был произведен разрез кожи в 4-м межреберье слева (рис. 1г). Далее ножницами раздвигали мышцы грудной стенки (широчайший мускул спины, зубчатый вентральный и косой брюшной наружный мускул). Эти группы мышц берутся на лигатуры (шелк хирургический 3-0), и с их помощью мышцы раздвигают в противоположные стороны. Используя глазной остроконечный пинцет Eye dressing forceps, serrated, angled (Fine Science Tools, США) и ножницы, рассекали межреберную мышцу и париетальную плевру, после чего в рану устанавливали ранорасширитель Mini-Goldstein 3x3 (Fine Science Tools). Затем осторожно тупым путем рассекали перикард и с его помощью отодвигали легкое к краю раны, высвобождая переднюю (нижнюю) поверхность сердца (рис. 1д). Манипулируя в операционной ране пинцетом и перикардом, приводили сердце в положение, удобное для нахождения левой коронарной артерии. Она имеет ярко красный цвет и пульсирует. В середине нисходящей ветви коронарной артерии с помощью атрауматичной иглы и нерассасывающейся нити Prolene 6/0 (Ethicon, США) накладывали лигатуру (рис. 1е). На правильность лигирования

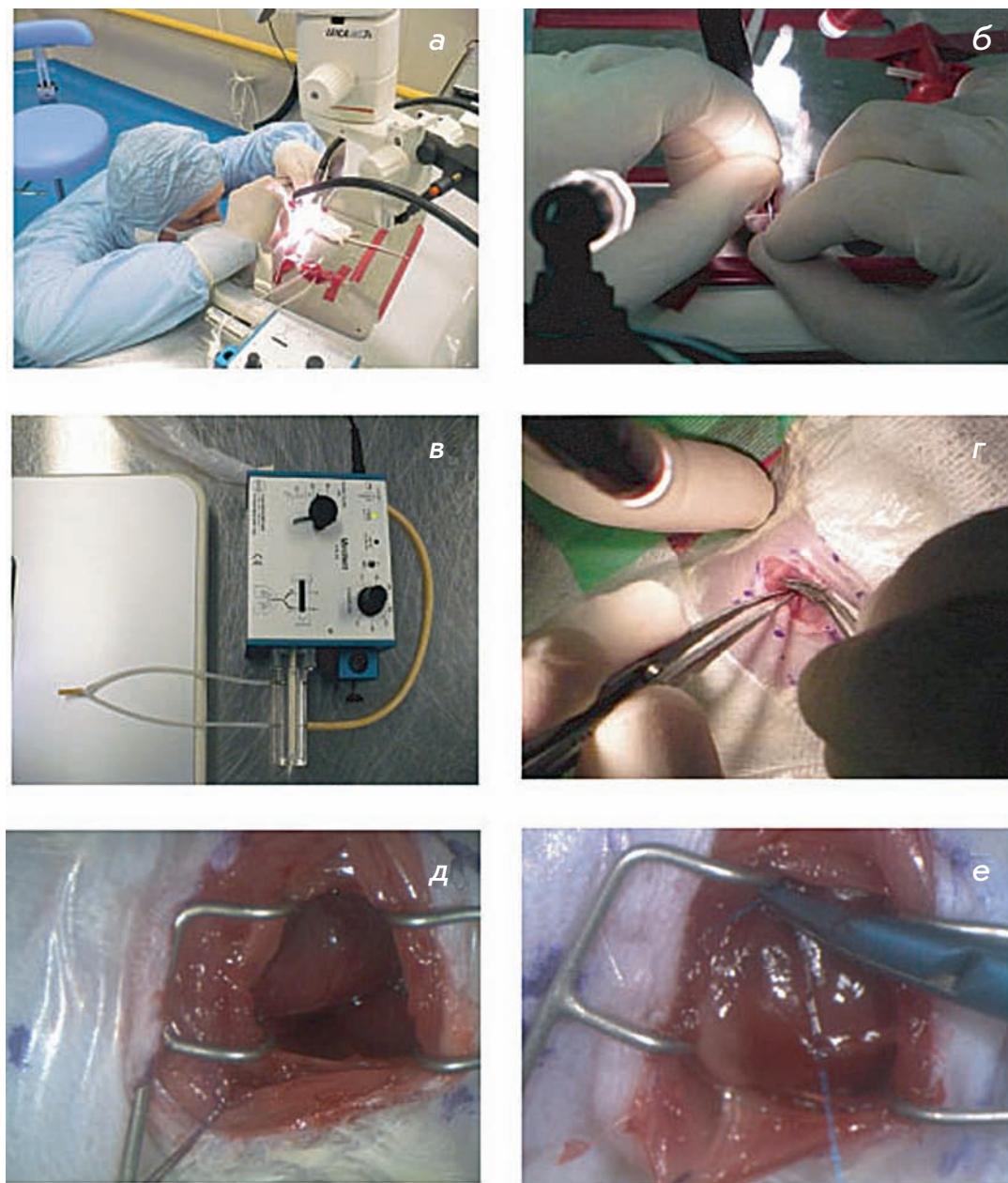


Рис. 1. Проведение предоперационных и операционных мероприятий при моделировании инфаркта миокарда у лабораторных мышей. а – Закрепление лабораторного животного на подогреваемом операционном столе; б – интубация трахеи; в – аппарат искусственной вентиляции легких MiniVent Ventilator for Mice; г – разрез кожи в 4-м межреберье слева; д – в операционной ране видна передняя (нижняя) поверхность сердца; е – лигирование нисходящей ветви коронарной артерии.

указывает быстро развивающаяся тахикардия, аритмия и анемия миокарда в области лигатуры. Затем возвращали на место перикард и легкое.

С учетом довольно значительной технической сложности идентификации коронарной артерии и ее лигирования, как вариант моделирования инфаркта миокарда, нами предложен способ создания зоны некроза при помощи электрокоагулятора. При этом способе моделирования инфаркта после выведения передней (нижней) поверхности сердца в операционную рану на миокард непосредственно воздействуют активным электродом электрокоагулятора,

что приводит к формированию зоны коагуляционного некроза.

После операционных мероприятий ребра вместе с плеврой ушивали двумя-тремя отдельными узловыми швами VICRYL 5-0 (Ethicon) и закрывали операционную рану в грудной стенке. Затем сдвигали отпрепарированные мышцы и плотно прижимали их друг к другу. Рану орошали стерильным физиологическим раствором. Далее на кожу накладывали непрерывный скорняжный шов, используя атравматичную иглу и рассасывающуюся нить VICRYL 4-0 (Ethicon), при этом пинцетом сдавливали



Рис. 2. Регистрация ЭКГ в послеоперационном периоде. К лабораторному животному, размещенному на подогреваемом операционном столике, подводили три электрода: по одному к левой (красный электрод) и правой (черный электрод) передним лапам, один (черный электрод) – к правой задней. На рисунке стрелочкой показана операционная рана, ушитая и покрытая алюминиевой суспензией Алюспрей.

грудную клетку в области раны так, чтобы удалить скопившийся воздух и создать отрицательное давление в грудной полости. Для защиты поверхности операционной раны кожу обрабатывали специальной суспензией микропористого алюминия Алюспрей (Vetoquinol, Франция), образующего тонкий слой алюминиевого покрытия на поверхности кожи (рис. 2).

Температурный режим

Для предотвращения возможного переохлаждения, связанного с наркотизацией в течение операции, животное находилось на подогреваемом операционном столике с температурой подогрева 32–34°C. Сразу после завершения операции животное переводили в камеру выздоровления Warm Air System (Vet Tech Solutions, Англия) с принудительной подачей подогреваемого (30–32°C) воздуха, обогащенного кислородом.

Послеоперационный период

Для послеоперационной анальгезии животному назначали ксилазин из расчета 10 мг/кг веса животного. После выхода из наркоза животное переводили в индивидуальную клетку. В клетку подавали увлажненный корм. При использовании рассасывающейся нити швы не снимают.

Регистрация параметров ЭКГ

Особая роль в диагностике инфаркта миокарда принадлежит ЭКГ. По изменениям ЭКГ можно определить локализацию инфаркта, его обширность и глубину – крупноочаговый, мелкоочаговый, интрамуральный, иногда также давность (в первые недели) и ряд других особенностей. Поэтому в нашей работе животным до и после лигирования коронарной артерии сердца и коагуляции для получения экспериментального инфаркта миокарда выполняли ЭКГ. Перед снятием ЭКГ мышь подвергали инъекционному наркозу с использованием золетил/ксилазинового раствора (золетил (тайлетамин+золазепам) 40–50 мг/кг, ксилазин 15–20 мг/кг живого веса животного). Затем мышь помещали в спинном положении на подогреваемый операционный столик и подводили три электрода: по одному к левой и правой передним лапам, один к правой задней лапе (рис. 2). Для измерения ЭКГ использовали аппарат – PowerLabSupport (ECG Analysis Module) (ADINSTRUMENTS, Австралия). Величину и продолжительность зубцов и интервалов устанавливали согласно предложенным параметрам программы ECG Analysis. Ширина процесса возбуждения и реполяризации составляла – 100 мс (Pre-P – 10 мс, PR – 50 мс, RT – 40 мс). ЭКГ измеряли до операции, через 5–10 мин после операции, на 3-й, 10-й и 30-й день после операции.

Морфологическое исследование

Морфологическому исследованию были подвергнуты 32 сердца мыши: в 21 случае инфаркт миокарда моделировали путем наложения лигатуры на левую коронарную артерию, в 11 случаях – контролируемой электрокоагуляцией участка миокарда. Все органы после их удаления помещали в 10% нейтральный формалин для фиксации на 1 сут. При макроскопическом исследовании сердца имели достаточно сходные размеры и вес: средний вес сердца мыши – 4 г, средний размер – 1.6 × 0.9 × 0.7 см. В 11 случаях, в которых некроз индуцировался контролируемой электрокоагуляцией, при макроскопическом исследовании на эпикарде левого желудочка определялся точечный след от электрода.

Для гистологического исследования каждое сердце разрезали на два кусочка вдоль межжелудочковой и межпредсердной перегородок и помещали в формалин комнатной температуры на 24 ч для дальнейшей фиксации. Далее кусочки промывали в проточной воде в течение 1–2 ч. Промытые кусочки подвергали обезвоживанию, используя несколько порций этилового спирта восходящей концентрации при комнатной температуре: в 70, 96 и дважды в 100% спирте (по 2 ч). Далее кусочки подготавливали к заливке в парафин: помещали в смесь спирта и ксилола (1 : 1)

на 2 ч при комнатной температуре и выдерживали в термостате при 60°C в смеси жидкого горячего парафина с ксилолом (1 : 1) в течение 2 ч. Обезвоженные и пропитанные парафином кусочки помещали в металлические формочки размером 2 × 2 × 2 см и вновь заливали растопленной парафиновой средой HISTOMIX (Biovitrum, Россия), получая при их остывании парафиновые блоки с кусочками органов в толще. Таким образом, из каждого сердца получались два парафиновых блока – с правыми или левыми отделами сердца и участками межжелудочковой и межпредсердной перегородок.

Цель гистологического исследования состояла в обнаружении очагов некроза миокарда, что потребовало изготовления серийных (последовательных) трансмуральных гистологических срезов толщиной 5 мкм из каждого блока через всю толщу сердечных стенок. Срезы изготавливали на ротационном микротоме марки ACCU-CUT SRM 200 (ACCU-CUT, Япония) и помещали на предметные стекла. Из каждого кусочка изготавливали в среднем 30 гистологических срезов. Далее срезы депарафинировали в растворе ксилотола в течение 15 мин и пропускали через порции этилового спирта с нисходящей концентрацией (дважды в 100% спирте по 3 мин и дважды ополаскивали в 96% спирте), после депарафинирования срезы промывали в дистиллированной воде и окрашивали гематоксилином Майера и эозином, окрашенные срезы покрывали полистиролом и заключали под покровное стекло.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты хирургического этапа

На первом этапе освоения метода моделирования инфаркта миокарда у лабораторных мышей было прооперировано 16 животных, 12 из которых выполнено лигирование коронарной артерии и четырем – контролируемая электрокоагуляция. ЭКГ в данной группе снимали у четырех животных. Летальность в этой группе составила 94,6%. В последующем животных этой группы в исследование не включали, приняв ее за группу отработки метода.

После отработки метода операции были проведены 32 животным (21 – лигирование коронарной артерии, 11 – контролируемая электрокоагуляция). При выполнении лигирования необходимо упомянуть следующие немаловажные детали и особенности. На всех описанных выше этапах операции крайне важно точное следование топографо-анатомическим ориентирам. В противном случае возможны возникновение неконтролируемого кровотечения и повреждение ткани легкого, что недопустимо, так как приводит к гибели лабораторного животного. После вскрытия перикарда следует визуализировать переднебоко-

вую стенку миокарда с проходящей там левой коронарной артерией. Вследствие малого диаметра последней, этап идентификации артерии представляет значительные трудности. Левая нисходящая ветвь коронарной артерии представлена опалесцирующим белесоватым тяжом, идущим в косопоперечном направлении относительно основного вектора операционного действия. После идентификации артерии под нее подводили синтетическую нить Prolene 6/0 на атравматичной игле. Артерию лигировали, формировали микрохирургический узел, концы нитей отсекали при помощи микрохирургических ножниц. На этапе лигирования артерии крайне важно точно контролировать толщину забираемой ткани, так как при слишком глубоком проведении иглы высока вероятность перфорации миокарда, что приводит к немедленному летальному исходу. Также важно правильное определение уровня наложения лигатуры, так как при наложении ее не на нисходящую ветвь, а на основной ствол левой коронарной артерии развивается обширный инфаркт миокарда, несовместимый с жизнью. Нами проведено сравнительное исследование различных типов шовного материала, используемого для лигирования артерии. В результате были выработаны критерии идеального для данной операции шовного материала. Это синтетический монофиламентный нерассасывающийся материал с отсутствием пилящего эффекта, примером которого может служить нить Prolene 6/0.

Среднее время операции в этой группе составило 57 мин (39–75 мин). Послеоперационная летальность, с начала экспериментов составлявшая 94,6% (в группе отработки методики), снизилась до 13,6%. Эти результаты соответствуют поставленным задачам и аналогичны представленным в литературе.

Показатели ЭКГ

У большинства мышей с экспериментальным инфарктом миокарда, вызванным лигированием коронарной артерии, после операции наблюдалось нарушение ритма – фибрилляция предсердий, и на 10-й день – ЭКГ-картина крупноочагового инфаркта миокарда, для которого характерно исчезновение зубца R, появление глубокого и широкого комплекса QS, подъем сегмента ST над изоэлектрической линией (рис. 3а–в). Формирование крупноочагового инфаркта наблюдалось и у некоторых мышей после коагуляции на 3-и и 9-е сут. В некоторых случаях коагуляция приводила к формированию поверхностного инфаркта миокарда (рис. 3г,д). В случае лигирования коронарной артерии сердца отмечено и возникновение тахикардии (патологический Q и снижение вольтажа R), переходящей в брадикардию на фоне инфаркта миокарда (рис. 3е,ж).

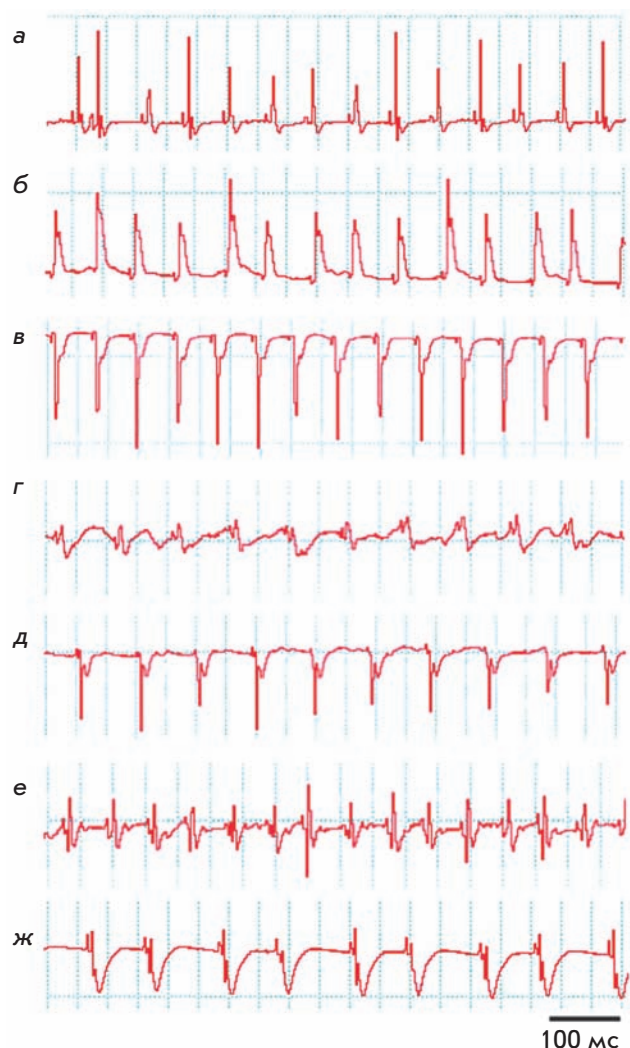


Рис. 3. ЭКГ-исследование лабораторных мышей. а – ЭКГ лабораторных мышей в норме до оперативного вмешательства; б – нарушение сердечного ритма через 5–10 мин после лигирования коронарной артерии; в – формирование крупноочагового инфаркта через 10 дней после лигирования коронарной артерии; г – результаты ЭКГ через 5–10 мин после коагуляции коронарной артерии; д – развитие поверхностного инфаркта через 10 дней после коагуляции коронарной артерии; е – развитие тахикардии через 5–10 мин после лигирования коронарной артерии; ж – развитие брадикардии на 3-й день после лигирования коронарной артерии. Ширина процесса возбуждения и реполяризации – 100 мс.

Результаты гистологического исследования

При гистологическом исследовании у 28 мышей (87,5%) выявлены очаги некроза, у 4 (12,5%) признаков некроза не обнаружено. Мыши, у которых некроз отсутствовал, относились к группе моделирования инфаркта путем наложения лигатуры на коронар-

ную артерию. Вероятно, это можно объяснить индивидуальными особенностями кровоснабжения сердца с хорошо развитой коллатеральной системой либо погрешностью метода. Известно большое количество анатомических типов кровоснабжения сердца человека, поскольку коронарные артерии широко варьируют в своем развитии, и, следовательно, удельный вес каждой из них в кровоснабжении левых и правых желудочков и предсердий в каждом случае также существенно колеблется. Помимо крайних форм – левовенечной и правовенечной, которые составляют 15% по данным Смольяникова и Наддачиной [14] – существует множество промежуточных форм кровоснабжения сердца. Можно предположить существование подобных особенностей кровоснабжения и в сердце мыши. Таким образом, в четырех случаях лигирование одной из коронарных артерий могло не повлиять на развитие инфаркта миокарда.

При моделировании инфаркта путем наложения лигатуры на коронарную артерию изменения обнаруживались в левом желудочке в виде мелких рассеянных очагов коагуляционного некроза групп кардиомиоцитов и их дезорганизации, отека стромы и кровоизлияний без воспалительной реакции (рис. 4а), в виде некроза отдельных клеток, что выражалось в исчезновении поперечной исчерченности саркоплазмы кардиомиоцитов и появления апоптоза. Эти изменения обнаруживались в разных участках левого желудочка (рис. 4б).

В случае контролируемой электрокоагуляции участка миокарда выявлялась полоса прямого коагуляционного некроза эпикарда и подлежащего поверхностного слоя кардиомиоцитов в зоне воздействия электрода (рис. 4в). В более глубоких слоях миокард характеризовался фрагментацией мышечных волокон, что является гистологическим признаком прижизненной фибрилляции левого желудочка и отеком интерстиция (рис. 4в, г). Фибрилляция желудочков, по-видимому, связана как с прямым воздействием электрода на сердечную мышцу, так и с вторичной ишемией, вызванной повреждением местного коронарного кровотока. Со временем эти участки могут также подвергнуться некротическим изменениям, и зона некроза расширится.

Следует учитывать, что с патоморфологической точки зрения инфаркт – это разновидность некроза, обусловленного абсолютной или относительной недостаточностью артериального кровоснабжения в органах, лишенных доступа к кислороду. Поскольку в случае электрокоагуляции участка миокарда некротические изменения в сердце вызваны, прежде всего, прямым воздействием электрода, подобные изменения расценивать как истинный инфаркт миокарда нецелесообразно. В основе инфаркта миокарда

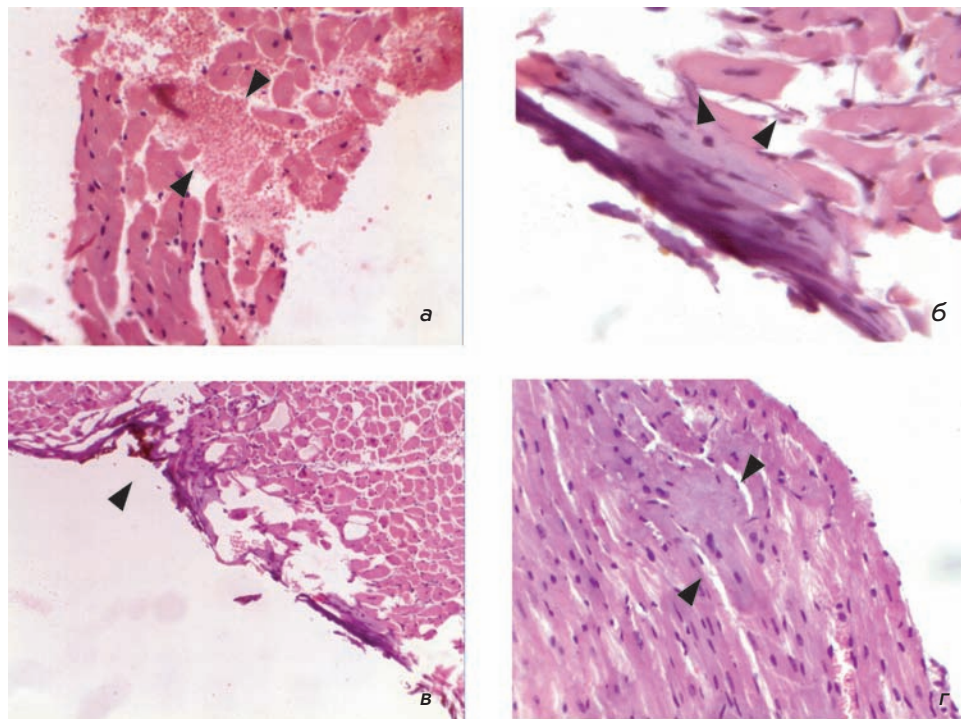


Рис. 4. Результаты гистологического исследования сердца лабораторных животных в результате моделирования инфаркта миокарда. а – Начинаяющийся коагуляционный некроз и дезорганизация кардиомиоцитов, отек стромы, кровоизлияние. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 20$; б – исчезновение поперечной исчерченности саркоплазмы кардиомиоцитов, фигуры апоптоза. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 60$; в – полоса прямого коагуляционного некроза эпикарда и подлежащего поверхностного слоя кардиомиоцитов в зоне воздействия электрода, отек интерстиция миокарда. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 10$; г – фрагментация мышечных волокон в результате фибрилляции. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 40$.

лежит коагуляционный (сухой) некроз кардиомиоцитов под воздействием гипоксии и развивающегося ацидоза тканей. Коагуляционный некроз развивается в тканях с низким содержанием жидкости, высоким содержанием белков и низкой активностью гидролитических ферментов. Другая разновидность гибели клеток, наблюдавшаяся в исследованном материале, – апоптоз.

Апоптоз – это генетически запрограммированная клеточная смерть, наблюдающаяся в норме в различных органах и тканях, особенно в тех, которые характеризуются постоянным обновлением клеток. Этот процесс осуществляется в результате активации определенных генов под воздействием различных стимулов. Путем апоптоза удаляются ненужные, «отработавшие» свой цикл клетки в ходе следующих процессов: эмбриогенеза, гомеостатической регуляции сохранения клеточной популяции в тканях, иммунной защиты, старения, а также при повреждении клеток различными патологическими факторами. В частности, гипоксия может вызывать апоптоз, если выраженность кислородной недостаточности не критическая, в то же время некроз клетки развивается при выраженном кислородном голодании. Гистологически наиболее очевидные изменения при апоптозе

касаются ядра. Хроматин конденсируется, образуя глыбки разной формы и размеров (кариопикноз), что при световой микроскопии проявляется в виде неправильных очертаний ядра и его гиперхромности. Аналогичную картину мы наблюдали при моделировании инфаркта путем наложения лигатуры на коронарную артерию. В дальнейшем в ходе апоптоза ядро клетки фрагментируется (кариорексис), цитоплазма делится на несколько связанных апоптозных телец путем формирования мембранных перемычек, в части цитоплазматических фрагментов ядерный материал может отсутствовать. Апоптозные тельца в итоге фагоцитируются окружающими здоровыми клетками или тканевыми макрофагами. В отличие от некроза, апоптозные тельца не вызывают ответного воспаления, поскольку целостность клеточной мембраны сохраняется до самого процесса фагоцитирования, что предотвращает выход клеточных ферментов в окружающие ткани и не вызывает хемотаксиса для клеток воспаления.

Таким образом, морфологическая картина изменений в группе мышцей, у которых инфаркт моделировали путем наложения лигатуры на левую коронарную артерию, и в группе с контролируемой электрокоагуляцией участка миокарда была разной. В первой

группе она характеризовалась наличием мелких рассеянных очагов некроза и очагов апоптоза в разных участках левого желудочка, что обусловлено большой площадью ткани, подвергшейся гипоксии. Незначительность очагов некроза при лигировании устья коронарной артерии, вероятно, обусловлена хорошо развитой сетью кровоснабжения между бассейном левой и правой коронарных артерий и отсутствием атеросклеротического поражения артерий. Во второй группе изменения имели характер локального поражения миокарда, вызванного преимущественно прямым поражением ткани. Согласно общепринятой среди морфологов стадийности инфаркта миокарда, обнаруженная гистологическая картина начинающегося коагуляционного некроза кардиомиоцитов, отека и кровоизлияний без воспалительной реакции соответствует давности инфаркта около 4–12 ч. Необратимые изменения в миокарде при наступлении критической ишемии начинаются уже через 0.5 ч, однако ни макроскопически, ни гистологически на этом этапе они не видны, обнаружить эти изменения можно только при электронно-микроскопическом исследовании. Только через 4 ч появляется незначительная внешняя пестрота ткани, и при гистологическом исследовании обнаруживаются вышеописанные изменения. После 12 ч от начала развития инфаркта усиливаются некротические изменения клеток с карioreксисом ядер и появляются первые лейкоциты. Через сутки отмечаются хорошо выраженные некроз кардиомиоцитов и интерстициальная инфильтрация нейтрофилами. На 4-е сут начинается фагоцитоз погибших кардиомиоцитов, к 10-м сут появляется грануляционная ткань в краях зоны инфаркта. Через 2 недели завершается замещение зоны инфаркта грануляционной тканью, появляется коллаген, и в течение последующих 6 недель формируется рубцо-

вая ткань. Обнаруженные нами изменения в первой группе сердец мышцы соответствуют ранней стадии инфаркта миокарда.

ВЫВОДЫ

Полученные нами в ходе данной работы результаты позволяют заключить, что оптимальным алгоритмом анестезиологического обеспечения при проведении операции моделирования инфаркта миокарда является инъекционный, смешанный золетил/ксилазиновый наркоз с миорелаксантами и искусственной вентиляцией легких. Соблюдение правильного температурного режима при работе с лабораторными мышцами стока CD-1 в пред-, интра- и послеоперационном периоде позволяет минимизировать смертность у лабораторных животных по нехирургическим причинам. Точное следование заданным топографо-анатомическим ориентирам при выполнении этапа торакотомии и перикардотомии позволяет минимизировать интраоперационную кровопотерю и возможность повреждения ткани легкого при осуществлении оперативного доступа. Оптимальным шовным материалом для лигирования нисходящей ветви левой коронарной артерии является Prolene 6/0. Согласно данным ЭКГ и постмортального гистологического исследования, предлагаемая методика позволяет говорить о создании принципиально корректной модели инфаркта миокарда на лабораторных мышцах, однако эта модель нуждается в отработке и изучении с целью дальнейшей стандартизации в соответствии с международными требованиями. ●

Работа поддержана Программой Министерства образования и науки (ГК 02.467.11.3010 и Соглашение 01.168.24.004).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Burgueño A.L., Landa M.S., Schuman M.L., Alvarez A.L., Carabelli J., García S.I., Pirola C.J. // *Metabolism*. 2007. V. 56(10). P. 1439–1443.
- Cascio W.E., Cozzi E., Hazarika S., Devlin R.B., Henriksen R.A., Lust R.M., van Scott M.R., Wingard C.J. // *Inhal Toxicol*. 2007. V. 19. P. 67–73.
- Matsuzawa N., Takamura T., Kurita S., Misu H., Ota T., Ando H., Yokoyama M., Honda M., Zen Y., Nakanuma Y., et al. // *Hepatology*. 2007. V. 46(5). P. 1392–1403.
- Cohen J.K., Cai L.Q., Zhu Y.S., La Perle K.M. // *Comp. Med*. 2007. V. 57(4). P. 370–376.
- Denvir M.A., Sharif I., Anderson T., Webb D.J., Gray G.A., McDicken W.N. // *J. Am. Soc. Echocardiogr*. 2005. V. 18(2). P. 155–162.
- Lee S., Schwinger R.H., Brixius K. // *Pflügers Arch*. 2008. V. 455(5). P. 767–774.
- Moura R., Tjwa M., Vandervoort P., Cludts K., Hoylaerts M.F. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2007. V. 27(10). P. 2163–2169.
- Nogueira B.V., Peotta V.A., Meyrelles S.S., Vasquez E.C. // *Arch. Med. Res*. 2007. V. 38(8). P. 816–821.
- Rajasingh J., Bord E., Hamada H., Lambers E., Qin G., Losordo D.W., Kishore R. // *Vet. Res. Commun*. 2007. V. 31. P. 35–41.
- Simpson E.R., Jones M.E. // *Ernst Schering Found. Symp. Proc*. 2006. V. 1. P. 45–67.
- Son N.H., Park T.S., Yamashita H., Yokoyama M., Huggins L.A., Okajima K., Homma S., Szabolcs M.J., Huang L.S., Goldberg I.J. // *J. Clin. Invest*. 2007. V. 117(10). P. 2791–2801.
- Tang Y., Liu W., Yu S., Wang Y., Peng Q., Xiong Z., Wang Y., Wei T. // *Plast. Reconstr. Surg*. 2007. V. 120(4). P. 869–878.
- Wang G.S., Kearney D.L., De Biasi M., Taffet G., Cooper T.A. // *J. Clin. Invest*. 2007. V. 117(10). P. 2802–2811.
- Смолянников А.В., Наддачина Т.А. Патологическая анатомия коронарной недостаточности. М.: Медицина, 1963.

УДК 577.2:616,577.2:579

Ассоциация аллелей генов цитокинов со степенью тяжести воспалительных заболеваний пародонта у человека

А. В. Сафонова¹, А. Н. Петрин¹, С. Д. Арутюнов¹, В. Н. Царев¹, Л. В. Акуленко¹,
О. А. Зорина², Д. В. Ребриков^{3,4}, А. В. Рубанович⁴, С. А. Боринская^{1,4}, Н. К. Янковский⁴

¹Московский государственный медико-стоматологический университет, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20/1

²ЦНИИС и ЧЛХ Росмедтехнологий, 119034, Москва, ул. Тимура Фрунзе, 16

³ЗАО «НПФ ДНК-Технология», 115478, Москва, Каширское ш., 24, корп. 2

⁴Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

*E-mail: safnastia@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.10.2010 г.

РЕФЕРАТ Гингивит и пародонтит – воспалительные заболевания тканей пародонта, на возникновение и течение которых влияют как средовые, так и наследственные факторы. Гены цитокинов, регулирующих иммунный ответ, могут быть важным звеном, опосредующим развитие этих заболеваний. В представленной работе проведен анализ ассоциации аллелей восьми генов цитокинов с различными клиническими проявлениями заболеваний пародонта в этнически гомогенной группе (296 молодых русских мужчин). Выявлены ассоциация минорных аллелей генов *IL1B* и *IL6* со степенью тяжести гингивита, а также ассоциация индекса гигиены полости рта ОНI-S с аллелями гена *IL18*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гингивит, пародонтит, гены цитокинов, генетический полиморфизм.

ВВЕДЕНИЕ

Гингивит (воспаление десны) и пародонтит (воспаление комплекса тканей, окружающих зуб) – широко распространенные стоматологические заболевания. При этом гингивит может встречаться как в сочетании с пародонтитом, так и независимо. Признаки поражения тканей пародонта проявляются уже у 6–7-летних детей [1], к 15 годам они регистрируются более чем у половины подростков, а распространенность заболеваний пародонта среди взрослого населения г. Москвы и других крупных городов достигает 98%. При этом более чем у 80% населения обнаруживаются симптомы гингивита [2].

Воспалительный процесс и деструкция тканей при заболеваниях пародонта обусловлены нарушением равновесия во взаимодействии клеток пародонта и бактериальных клеток, обитающих в полости рта, в частности в зубном налете. Патогенные процессы, характерные для гингивита и пародонтита, являются результатом иммунопатологической реакции, которую запускают бактерии, присутствующие в зубном налете. Эта реакция ведет к прогрессирующему волнообразному хроническому воспалению с развитием деструктивных процессов.

Известно, что важную роль в патогенезе гингивита и пародонтита играет регуляция воспалительного

ответа [3]. Изучение изменений транскриптома в гингивальных биоптатах при развитии и излечении экспериментального гингивита показало, что при развитии заболевания изменяется уровень экспрессии десятков генов иммунного ответа, в том числе генов интерлейкинов – *IL1A*, *IL1B*, *IL8*, и ряда других [4]. При этом уровень транскрипции одних генов повышается, а других понижается. При излечении заболевания экспрессия этих генов возвращается к исходному уровню.

Роль генетической конституции индивида в предрасположенности к воспалительным заболеваниям пародонта и интенсивности их прогрессии изучена недостаточно. В ассоциативных исследованиях показано, что у носителей определенных аллелей некоторых генов цитокинов повышен риск развития гингивита и/или пародонтита [5–9]. Однако эти данные довольно противоречивы [6, 10, 11].

Цель нашей работы состояла в изучении ассоциации между степенью тяжести заболеваний пародонта и носительством аллелей, влияющих на уровень транскрипции восьми генов цитокинов человека, уровень которых меняется в зависимости от степени тяжести воспалительных и деструктивных процессов тканей пародонта. Предполагается, что полученные результаты позволят выявить потенциальные группы генетического риска воспалительных забо-

Таблица 1. Полиморфные сайты генов цитокинов, исследованные в данной работе

Ген	Хромосома	SNP	Идентификатор dbSNP	Функция цитокина	Ссылка
<i>IFNG</i>	12q14	+874 T>A	rs2430561	Увеличение экспрессии HLA II антигенпрезентирующими клетками, увеличение экспрессии молекул межклеточной адгезии, усиление пролиферации Т-клеток и продукции Th1-цитокинов	[14]
<i>IL1A</i>	2q14	-889 C>T	rs1800587	Провоспалительный цитокин. Активация остеокластов, активация Т-клеток, активация матриксных металлопротеаз	[15, 16]
<i>IL1B</i>	2q14	-511 G>A	rs16944		
<i>IL4</i>	5q31.1	-590 C>T	rs2243250	Снижение продукции провоспалительных цитокинов, поддержка дифференцировки В-клеток и продукции антител	[17]
<i>IL6</i>	7p21	-174 G>C	rs1800795	Активация остеокластов, поддержка дифференцировки В-клеток и продукции антител	[18]
<i>IL10</i>	1q31-q32	-592 C>A	rs1800872	Подавляет репликацию Т-клеток и синтез провоспалительных цитокинов, поддерживает пролиферацию и дифференцировку В-клеток и продукцию антител	[18]
<i>IL18</i>	11q22.2-q22.3	-607 G/T	rs1946518	Провоспалительный цитокин. Усиление продукции IFN- γ Т-клетками	[19–21]
<i>TNF</i>	6p21.3	-308 G>A	rs1800629	Активация остеокластов, активация матриксных металлопротеаз, увеличение экспрессии HLA II антигенпрезентирующими клетками, увеличение экспрессии молекул межклеточной адгезии	[19–21]

леваний пародонта, а в дальнейшем могут использоваться в профилактической персонализированной медицине.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Обследована группа из 296 мужчин-военнослужащих в возрасте от 20 до 52 лет (средний возраст 27.0 ± 6.3 года). Обследование проводилось во время планового медицинского осмотра с соблюдением процедуры «информированного согласия» и сбором данных о национальной принадлежности и месте рождения самих участников и двух поколений их предков. В исследуемую группу вошли преимущественно русские мужчины (доля потомков от смешанных браков русских, украинцев и белорусов составила 6.5%). Всем обследуемым проведен стандартный внешний стоматологический осмотр и инструментальный осмотр полости рта. Описание стоматологического статуса включало оценку интенсивности воспалительных и деструктивных процессов, а также индекса гигиены полости рта.

Для оценки степени тяжести гингивита использовали папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (РМА [12]). С этой целью оценивали в баллах показатели состояния десны у каждого зуба после ее окрашивания красителями, выявляющими воспаленные участки, и вычисляли усредненное значение по всем обследованным зубам. Отсутствию гингивита соответствует значение РМА = 0, значения РМА до 30% включительно соответствуют гингиви-

ту легкой степени, от 31 до 60% – гингивиту средней степени тяжести, а более 60% – гингивиту тяжелой степени.

Обследование глубины пародонтального (зубодесневого) кармана (Probing Pocket Depth, PPD) проводилось с помощью специального пародонтологического зонда. Регистрировали наибольшее значение глубины (мм) зубодесневого кармана, затем все значения суммировали и делили на количество обследованных зубов.

Гигиеническое состояние полости рта (количество зубного камня и зубного налета) оценивали по индексу ОИ-С (Oral Hygien Indices – Simplified) [13].

Образцы венозной крови собирали в вакуумированные пробирки с EDTA. ДНК из образцов крови выделяли стандартным фенол-хлороформным методом. Аллели анализируемых генов генотипировали дважды с использованием набора «Иммуногенетика» (ООО «НПО ДНК-технология», Москва). ПЦР-амплификацию и генотипирование проводили в 384-луночных плашках на амплификаторе ДТ-384 фирмы «НПО ДНК-технология», Москва. Исследовали восемь генов цитокинов: γ -интерферона (IFN- γ), α - и β -субъединиц интерлейкина 1 (IL-1 α и IL-1 β), интерлейкинов (IL-4, IL-6, IL-10, IL-18) и фактора некроза опухолей α (TNF α) (табл. 1). Для анализа были выбраны полиморфные участки преимущественно в промоторных областях, влияющие на уровень экспрессии указанных генов. Список полиморфных сайтов приведен в табл. 1.

Таблица 2. Средние значения стоматологических показателей у носителей различных генотипов полиморфных сайтов восьми генов цитокинов

Генотип		N	Стоматологические показатели (\pm SE)*			Эффект минорного аллеля**
			PMA	PPD	ОHI-S	
IFNG (+874)	A/A	67	0.25 \pm 0.02	1.61 \pm 0.10	1.85 \pm 0.09	$p > 0.2$ для всех показателей
	T/A	127	0.22 \pm 0.01	1.42 \pm 0.06	1.74 \pm 0.07	
	T/T	87	0.24 \pm 0.04	1.48 \pm 0.07	1.78 \pm 0.07	
IL1A (-889)	C/C	140	0.22\pm0.01	1.40 \pm 0.06	1.72 \pm 0.06	PMA \downarrow рецессивный $p = 0.026$
	C/T	118	0.26\pm0.02	1.59 \pm 0.07	1.84 \pm 0.07	
	T/T	27	0.20\pm0.02	1.45 \pm 0.11	1.79 \pm 0.12	
IL1B (-511)	A/A	29	0.26 \pm 0.03	1.41 \pm 0.11	1.77 \pm 0.12	PMA \uparrow рецессивный $p = 0.157$
	G/A	122	0.23 \pm 0.02	1.44 \pm 0.07	1.80 \pm 0.07	
	G/G	133	0.22 \pm 0.01	1.49 \pm 0.06	1.76 \pm 0.06	
IL4 (-590)	C/C	171	0.24 \pm 0.01	1.49 \pm 0.06	1.79 \pm 0.05	$p > 0.5$ для всех показателей
	C/T	98	0.23 \pm 0.02	1.45 \pm 0.07	1.78 \pm 0.07	
	T/T	14	0.19 \pm 0.04	1.51 \pm 0.22	1.57 \pm 0.20	
IL6 (-174)	C/C	61	0.25\pm0.02	1.53 \pm 0.10	1.70 \pm 0.07	PMA \uparrow доминантный $p = 0.003$
	G/C	139	0.24\pm0.01	1.48 \pm 0.06	1.83 \pm 0.07	
	G/G	85	0.21\pm0.02	1.46 \pm 0.08	1.74 \pm 0.08	
IL10 (-592)	A/A	23	0.24 \pm 0.03	1.57 \pm 0.15	1.66\pm0.16	ОHI-S \downarrow доминантный $p = 0.043$
	C/A	110	0.22 \pm 0.01	1.46 \pm 0.07	1.72\pm0.06	
	C/C	152	0.24 \pm 0.01	1.49 \pm 0.06	1.84\pm0.06	
IL18 (-607)	C/C	85	0.25 \pm 0.02	1.50 \pm 0.08	1.69\pm0.07	ОHI-S \uparrow рецессивный $p = 0.022$; PMA \uparrow рецессивный $p = 0.188$
	A/C	140	0.21 \pm 0.01	1.44 \pm 0.06	1.75\pm0.06	
	A/A	57	0.27 \pm 0.02	1.57 \pm 0.09	1.96\pm0.09	
TNF (-308)	A/A	4	0.17 \pm 0.04	1.45 \pm 0.22	1.83 \pm 0.25	$p > 0.2$ для всех показателей
	G/A	68	0.25 \pm 0.02	1.50 \pm 0.08	1.84 \pm 0.09	
	G/G	212	0.23 \pm 0.03	1.48 \pm 0.05	1.76 \pm 0.05	

*Выделены случаи значимых ассоциаций.

**Стрелка указывает на повышенное или пониженное значение показателя у носителей минорного аллеля (доминантный эффект) либо у гомозигот по минорному аллелю (рецессивный эффект). Приведены минимальные уровни значимости, оцененные в перестановочном тесте.

Статистический анализ проводили стандартными методами с помощью пакета WinSTAT 2003.1, интегрированного в Excel. Для межгрупповых сравнений стоматологических индексов применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. При оценке отношения шансов (OR) и значимости отличий частот по точному тесту Фишера использовали свободно распространяемый пакет программ WinPepi: <http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html> [22]. Поправки на множественность сравнений вводили с помощью перестановочного теста (100000 симуляций), реализованного в программной среде Mathematica 5.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В обследованной когорте (296 мужчин) лишь у 1.0% (три человека) отсутствовали признаки воспаления десны (PMA = 0), у 67.6% (205 человек) выяв-

лен гингивит легкой степени, у 31.4% (93 человека) обнаружен гингивит средней (81 человек) и тяжелой степени (12 человек) (индекс PMA > 30%). Глубина пародонтального кармана варьировала от 0.6 до 4.5 мм, среднее значение в обследованной когорте составило 1.50 ± 0.73 мм (\pm S.D.). Индекс гигиены полости рта ОHI-S варьировал от 0 до 3.8 баллов, среднее значение – 1.79 ± 0.73 , что соответствует неудовлетворительному уровню гигиены. Определили генотипы всех обследованных по каждому из восьми локусов. По техническим причинам генотипы по некоторым сайтам установлены не у всех индивидов, поэтому суммарное число генотипов по каждому гену различается.

Стоматологические индексы можно рассматривать как количественные признаки, поэтому для оценки возможного влияния генов на значение признаков были вычислены средние значения индексов у но-

сителей каждого генотипа по исследуемым генам. Значимые различия между средними значениями какого-либо индекса у носителей разных генотипов указывают на возможное влияние гена на данный признак. При этом различия между носителями рассматриваемого аллеля и теми, у кого аллель отсутствует (гомозиготные носители альтернативного аллеля), указывают на доминантный эффект рассматриваемого аллеля и рецессивный эффект альтернативного аллеля. Возрастание значения признака в зависимости от числа копий аллеля в генотипе (0, 1 или 2) соответствует аддитивной модели (определяется значимость регрессии значения признака на число копий аллеля).

У носителей различных генотипов по восьми генам цитокинов были вычислены средние значения стоматологических показателей (табл. 2). В правом столбце табл. 2 приведены уровни значимости эффектов минорных аллелей, вычисленные с помощью перестановочного теста. В 100 000 перестановок одновременно оценили эффекты минорных аллелей согласно доминантной, рецессивной и аддитивной моделям. Полученные оценки значимости использовали как ориентир для дальнейшей проверки значимости ассоциаций. Рассмотрение модели аддитивного действия аллеля дало не более значимые результаты, чем анализ рецессивного/доминантного эффектов, поэтому данные для аддитивной модели не приведены.

Достоверное повышение среднего значения индекса РМА выявлено у носителей аллеля *IL6*(-174)C* (табл. 2). Величина показателя РМА коррелирует с возрастом обследованных лиц ($r = 0.16$ при $p = 0.004$), поэтому влияние гена проверяли по отдельности в двух возрастных группах (до 30 лет – 215 человек; 30 лет и более – 70 человек). В каждой возрастной когорте выявлена значимая ассоциация аллеля *IL6*(-174)C* с повышенным значением РМА по доминантной схеме (рис. 1). При разбиении каждой возрастной когорты на группы с высоким значением РМА ($\geq 30\%$, соответствует гингивиту средней и тяжелой степени) и низким значением ($< 30\%$, соответствует норме и гингивиту легкой степени) носители аллеля *IL6*(-174)C* имели больший риск оказаться в группе со средним и тяжелым гингивитом. Соответствующие отношения шансов равны: $OR = 2.22$ при $p = 0.031$ в группе лиц моложе 30 лет и $OR = 3.78$ при $p = 0.052$ в группе лиц 30 и более лет. Однородность эффектов в двух возрастных группах (различия OR в возрастных когортах незначимы, $p = 0.469$ по критерию χ^2) позволяет перейти к оценке отношения шансов в объединенной выборке: $OR = 2.56$ при $p = 0.002$ (95%CI = 1.32–5.21).

Аналогичные расчеты для сайта *IL1A*(-889)* показывают, что риск развития гингивита средней

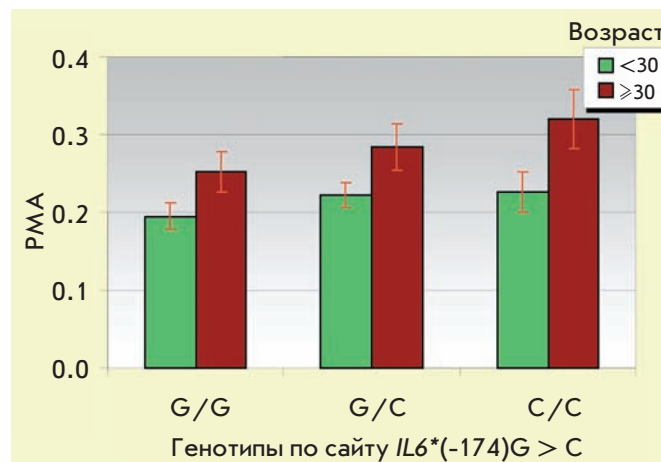


Рис. 1. Средние значения (\pm SE) индекса РМА у носителей различных генотипов по гену *IL6(-174)* в двух возрастных группах (младше 30 лет, 215 человек; 30 и более лет, 70 человек).

или тяжелой степени ($PMA > 30$) повышен у носителей мажорного аллеля С по сравнению с носителями генотипа Т/Т: $OR = 3.86$ при $p = 0.026$ (95%CI = 1.14–13.10).

Помимо оценки эффекта отдельных генов было рассмотрено их попарное действие. Выявлено совместное действие минорных аллелей рассмотренного выше сайта *IL6*(-174)* гена *IL6* и *IL1B*(-511)* гена *IL1B*, значимые эффекты которого не были обнаружены на предыдущем этапе анализа. При рассмотрении совместного действия двух генов, как и на предыдущем этапе, анализировали их влияние на изменение среднего значения РМА и ассоциацию с гингивитом средней и тяжелой степени.

Наименьшие средние значения РМА были характерными для двойных гомозигот по обоим сайтам. По мере увеличения числа минорных аллелей по сайтам *IL1B*(-511)* и *IL6*(-174)* увеличиваются и средние значения показателя РМА (рис. 2). Обнаруженные различия в значении индекса РМА (в 2.3 раза) между крайними классами (двойные гомозиготы по минорным аллелям против гомозигот по мажорным аллелям) значимы по тесту Манна–Уитни ($p = 0.0067$).

На рис. 3 представлены распределения общего числа копий минорных аллелей в сайтах *IL1B*(-511)* и *IL6*(-174)* у больных гингивитом тяжелой и средней степени ($PMA \geq 30$) и в группе с легким гингивитом и здоровых ($PMA < 30$). Видно, что носители хотя бы одного из минорных аллелей генов *IL1B*(-511)* и *IL6*(-174)* чаще встречаются среди индивидов с более тяжелым течением гингивита. Риск развития гингивита средней или тяжелой степени ($PMA \geq 30$) у гомозиготных носителей минорных ал-

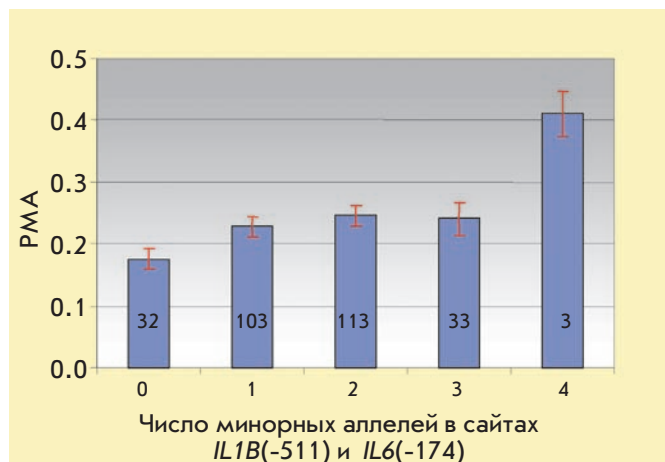


Рис. 2. Средние значения (\pm SE) показателя PMA в зависимости от числа минорных аллелей в сайтах *IL1B*(-511) и *IL6*(-174). На столбиках указано число лиц с данным генотипом.

лелей (*IL1B**(-511)A и *IL6**(-174)C выше, чем у гомозиготных носителей мажорных аллелей (*IL1B**(-511)G и *IL6**(-174)G) и характеризуется отношением шансов, равным $OR = 7.63$ при $p = 0.0009$ (95%CI= 1.80–32.45). Доля гомозиготных носителей минорных аллелей (индивиды с сочетанием генотипов A/A по сайту *IL1B**(-511) и C/C по сайту *IL6**(-174), ассоциированным с более тяжелым течением гингивита) составила в изученной группе 1.1% (три человека из 284, у которых определены генотипы по данным генам), а доля индивидов с «протективным» сочетанием генотипов G/G и G/G по тем же сайтам составила 11.3% (32 человека). Этот эффект должен быть подтвержден на выборках большего размера, но в пользу неслучайности выявленной ассоциации свидетельствует повышение эффекта при увеличении числа минорных аллелей (рис. 2).

Профилактика и лечение болезней пародонта являются одной из актуальных проблем современной стоматологии. Заболевания пародонта встречаются уже в детском возрасте, а к 30 годам почти у половины населения обнаруживаются выраженные клинические проявления этой патологии. При этом проблема профилактики и эффективного лечения поражений пародонта остается нерешенной [23]. Проявление клинических признаков этих заболеваний зависит от возраста, вредных привычек, общего состояния здоровья и тесно связано с гигиеническими навыками. В связи с этим интересным в научном отношении и практически важным представляется обнаруженный нами феномен ассоциации значений индекса гигиены ОНI-S с полиморфными сайтами в генах интерлейкинов. Индекс ОНI-S повышен у го-

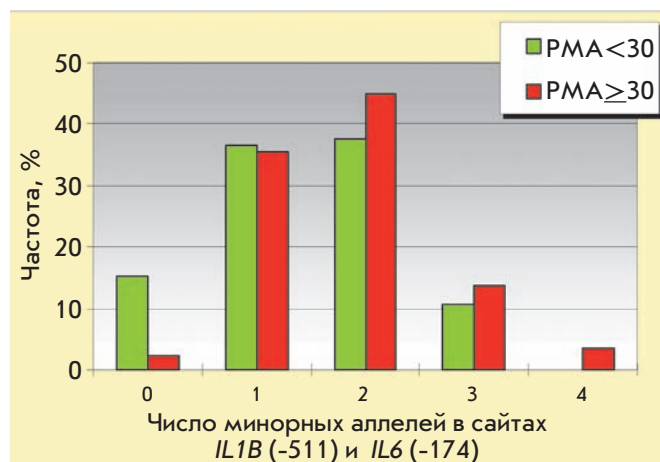


Рис. 3. Распределение общего числа копий минорных аллелей в сайтах *IL1B*(-511) и *IL6*(-174) в зависимости от степени тяжести гингивита. Число индивидов с PMA ≥ 30 (гингивит средней и тяжелой степени) составляет 87 человек, с PMA < 30 (гингивит легкой степени и норма) – 197 человек.

момозиготных носителей аллеля *IL10**(-592)C (значение индекса составляет 1.84 ± 0.06 против 1.71 ± 0.06 у носителей аллеля A, однако различия незначимые – $p = 0.092$ по тесту Манна–Уитни). Значимые различия наблюдаются у индивидов с разными генотипами по полиморфизму *IL18**(-607) G > A. У носителей гомозиготного генотипа A/A значение индекса ОНI-S составляет 1.96 ± 0.09 против 1.73 ± 0.05 у носителей аллеля G (различие значимо, $p = 0.018$ по тесту Манна–Уитни). Так как различия в гигиенических навыках вряд ли связаны с генотипом, можно предположить, что у индивидов, гомозиготных по аллелю *IL18**(-607)A, происходит более интенсивное образование бляшек и зубного налета, что отражается на более высоком значении индекса гигиены полости рта.

Не обнаружено ассоциации показателя PPD (глубина пародонтального кармана) с изученными аллелями генов цитокинов.

В нашей работе выявлена ассоциация степени тяжести гингивита с носительством аллелей *IL1A**(-889)C и *IL6**(-174)C, а также усиление эффекта последнего аллеля в присутствии *IL1B**(-511)A. Полиморфизм 511 A \rightarrow G при определенных условиях влияет на уровень экспрессии гена *IL1B* и ассоциирован с воспалительными и онкологическими заболеваниями [11, 24]. Интерлейкин 1 – провоспалительный цитокин, выделяемый моноцитами, макрофагами и дендритными клетками. Ген *IL1* стал одним из первых генов, для которых показали ассоциацию однонуклеотидных полиморфизмов с воспалитель-

ными заболеваниями пародонта [5]. Роль интерлейкина 1 в развитии заболеваний пародонта заключается в индукции медиаторов воспаления. Показано, что в линиях иммортализованных гингивальных фибробластов человека в присутствии интерлейкина 1 повышается уровень транскрипции генов воспалительных цитокинов, хемокинов, металлопротеаз, молекул клеточной адгезии и фактора транскрипции NF- κ B, контролирующего экспрессию генов иммунного, антиапоптотического ответа и клеточного цикла. Активация NF- κ B блокирует апоптоз, тем самым вызывая стабилизацию гингивальных фибробластов *in vitro* [25]. Ассоциацию полиморфных маркеров в кластере генов интерлейкина 1 (*IL1A*, *IL1B* и *IL1RN*, ген антагониста рецептора IL1) с пародонтитом и гингивитом удалось выявить лишь в некоторых работах [11].

Интерлейкин 6 – мультифункциональный цитокин, играющий важную роль в воспалительном ответе на инфекционные агенты (особенно грамотрицательные бактерии) [26]. У носителей минорного аллеля С в позиции -174 регуляторного участка гена *IL6* снижена продукция цитокина, что может нарушать иммунную защиту [27]. При изучении ассоциации обоих генов с заболеваниями пародонта получены противоречивые данные. Так, анализ ассоциации хронического пародонтита с полиморфизмом *IL6*(-174), выполненный в шести европеоидных популяциях, выявил существование ассоциации в трех из них [11]. Участие генов интерлейкинов может проявляться как в регуляции воспалительного ответа, так и в различиях в спектре патогенов ротовой полости у носителей разных генотипов. Показано, что у носителей определенных генотипов по полиморфизму *IL6*(-174) в сублингвальных биопленках чаще обнаруживаются патогенные бактерии *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Porphyromonas gingivalis* [8]. Противоречия результатов, полученных разными авторами, могут объясняться изменением связи между изучаемыми факторами в зависимости от возраста, этнической гомогенности и других особенностей использованных когорт.

Образование зубного налета и зубного камня представляет собой сложный процесс, зависящий

от уровня гигиены полости рта, микробиоты и локального иммунитета. Генетически детерминированные особенности иммунного ответа могут влиять на образование зубного налета и соответственно на индекс гигиены полости рта (ОИ-S). Интерлейкин 18 – провоспалительный цитокин, а возможно, и один из основных цитокинов, вовлеченных в развитие патологических процессов и деструкцию тканей пародонта, синтезируется макрофагами/моноцитами и клетками эпителия ротовой полости, стимулирует клеточный иммунитет и индуцирует продукцию IFN- γ . Уровень интерлейкина 18 повышен при различных хронических воспалительных заболеваниях. Содержание интерлейкина 18 в десневой жидкости увеличивается пропорционально тяжести воспаления пародонта и снижается до исходного уровня после излечения [28, 29]. Полиморфизм -607 C \rightarrow A в регуляторном участке гена *IL18* локализован в сайте связывания фактора транскрипции CREB (cAMP response-element binding protein) [30]. В культуре клеток от доноров, несущих аллель А, показано значительное увеличение как спонтанной, так и индуцированной липополисахаридами продукции интерлейкина 18 [31]. Насколько известно авторам, ассоциация индекса гигиены ОИ-S с аллелями генов интерлейкинов ранее не описана. Выявленные ассоциации значимы для исследованной нами этнически однородной выборки (русские). К настоящему времени ясно, что степень выраженности воспалительных и деструктивных процессов при заболеваниях пародонта имеет генетическую компоненту, и эти заболевания должны рассматриваться как мультифакторные [11]. Однако вклад определенных генов в формирование предрасположенности или устойчивости к воспалительным заболеваниям пародонта требует дальнейшего изучения, особенно на различном генетическом фоне, который может быть этнически специфичным. Поэтому практическая значимость выявленных ассоциаций делает особенно интересной проверку данных наблюдений на независимых выборках иной этнической специфичности. ●

Работа поддержана Программой Президиума РАН «Фундаментальные науки медицине».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грудянов А.И., Кирюхина С.А., Воробьев В.С. // Стоматология. 1995. № 6. С. 16.
2. Артюшкевич А.С. Заболевания периодонта. М.: Мед. лит., 2006. 328 с.
3. Дмитриева Л.А., Романов А.Е., Царев В.Н. Клинические и микробиологические аспекты применения реставрационных материалов и антисептиков в комплексном лечении заболеваний пародонта. М: МЕДпресс-информ, 2002. 96 с.
4. Offenbacher S., Barros S.P., Paquette D.W., Winston J.L., Biesbrock A.R., Thomason R.G., Gibb R.D., Fulmer A.W., Tiesman J.P., Juhlin K.D., Wang S.L., Reichling T.D., Chen K.S., Ho B. // J. Periodontol. 2009. V. 80 (1). P. 1963–1982.
5. Kornman K.S., Crane A., Wang H.Y., di Giovine F.S., Newman M.G., Pirk F.W., Wilson T.G., Higinbottom F.L., Duff G.W. // J. Clin. Periodontol. 1997. V. 24 (1). P. 72–77.
6. Kinane D.F., Shiba H., Hart T.C. // Periodontol. 2005. V. 39. P. 91–117.

7. Holla L.I., Musilova K., Vokurka J., Klapusová L., Pantuckova P., Kukletova M., Kukla L., Znojil V. // *Acta Odontol. Scand.* 2008. V. 66 (2). P. 105–112.
8. Nibali L., Tonetti M.S., Ready D.R., Parkar M., Brett P.M., Donos N., D'Aiuto F. // *J. Periodontol.* 2008. V. 79. P. 677–683.
9. Trombelli L., Scapoli C., Carrieri A., Giovannini G., Calura G., Farina R. // *J. Clin. Periodontol.* 2010. V. 37(8). P. 697–704.
10. Nibali L., Donos N., Henderson B. // *J. Med. Microbiol.* 2009. V. 58. P. 1269–1274.
11. Laine M.L., Loos B.G., Crielaard W. // *Internat. J. Dentistry.* 2010. Article ID 324719, 22 p.
12. Parma C. *Parodontopathien.* Leipzig: C Parma, 1960. 203 p.
13. Greene J.C., Vermillion J.R. // *J. Am. Dent. Assoc.* 1964. V. 68. P. 7–13.
14. Okamura H., Tsutsui H., Komatsu T., Yutsudo M., Hakura A., Tanimoto T., Torigoe K., Okura T., Nukada Y., Hattori K., et al. // *Nature.* 1995. V. 378. P. 88–91.
15. Micallef M.J., Ohtsuki T., Kohno K., Tanabe F., Ushio S., Namba M., Tanimoto T., Torigoe K., Fujii M., Ikeda M., et al. // *Eur. J. Immunol.* 1996. V. 26. P. 1647.
16. Gleichmann E., Pals S.T., Rolink A.G., Radaszkiewicz T., Gleichmann H. // *Immunol. Today.* 1984. V. 5. P. 324.
17. Romas E., Martin T.J. // *Osteoporos Int.* 1997. V. 7. P. 47–53.
18. Dayer J.M., Arend W.P. // *Philadelphia: Saunders.* 1997. V. 5. P. 267–286.
19. Schett G., Tohidast-Akrad M., Smolen J.S., Schmid B.J., Steiner C.W., Bitzan P., Zenz P., Redlich K., Xu Q., Steiner G. // *Arthritis Rheum.* 2000. V. 43. P. 2501–2512.
20. Kobayashi K., Takahashi N., Jimi E., Udagawa N., Takami M., Kotake S., Nakagawa N., Kinosaki M., Yamaguchi K., Shima N., et al. // *J. Exp. Med.* 2000. V. 191. P. 275–285.
21. Fuller K., Owens J.M., Jagger C.J., Wilson A., Moss R., Chambers T.J. // *J. Exp. Med.* 1993. V. 178. P. 1733–1744.
22. Abramson J.H. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiologic Perspectives & Innovations.* 2004. V. 1. P. 6.
23. Грудянов А.И., Овчинникова В.В. Профилактика воспалительных заболеваний пародонта. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. 80 с.
24. Rogus J., Beck J.D., Offenbacher S., Huttner K., Iacoviello L., Latella M.C., de Gaetano M., Wang H.Y., Kornman K.S., Duff G.W. // *Hum. Genet.* 2008. V. 123 (4). P. 387–398.
25. Vardar-Sengul S., Arora S., Baylas H., Mercola D. // *J. Periodontol.* 2009. V. 80 (5). P. 833–849.
26. Dalrymple S.A., Slattery R., Aud D.M., Krishna M., Lucian L.A., Murray R. // *Infect. Immun.* 1996. V. 64 (8). P. 3231–3235.
27. Fishman D., Faulds G., Jeffrey R., Mohamed-Ali V., Yudkin J.S., Humphries S., Woo P. // *J. Clin. Investigation.* 1998. V. 102 (7). P. 1369–1376.
28. Pradeep A.R., Hadge P., Chowdhry S., Patel S., Happy D. // *J. Oral Sci.* 2009. V. 51. P. 261–266.
29. Orozco A., Gemmell E., Bickel M., Seymour G.J. // *Oral Microbiol. Immunol.* 2006. V. 21 (4). P. 256–260.
30. Giedraitis V., He B., Huang W.-X., Hillert J. // *J. Neuroimmunol.* 2001. V. 112 (1–2). P. 146–152.
31. Khripko O.P., Sennikova N.S., Lopatnikova J.A., Khripko J.I., Filipenko M.L., Khrapov E.A., Gelfgat E.L., Yakushenko E.V., Kozlov V.A., Sennikov S.V. // *Mediators Inflamm.* 2008. Article ID 309721. 6 p.

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.

После принятия статьи к публикации редакция заключает с авторами лицензионный договор о передаче права на использование произведения.

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». 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: сноска (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 μM ; 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 « \cdot » 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, Pe, Val и т.д.) и фосфатов (АТР, 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 специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Рукопись, направленная авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, рецензируется повторно,

после чего редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости ее для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся даты поступления рукописи в редакцию и принятия рукописи в печать после положительного решения рецензента.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с первоначальным вариантом статьи, а также ответами на все замечания.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде PDF-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте в порядке их цитирования, нумеруются и приводятся в квадратных скобках. Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Для книг: фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

Для периодических изданий: фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Указываются фамилии первых 10 авторов, например:

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

Ссылки на *авторефераты* диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

Для связи с редакцией следует использовать следующие электронные адреса: vera.knorre@gmail.com, actanaturae@gmail.com, телефоны: (495) 727-38-60, (495) 930-80-05.

Подписка на 2011 год Скидка 10%

+7 495 930-88-06

Подробности на сайте: www.actanaturae.ru

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПАРАМЕТРЫ СТЕЖИГ-ВЗАИМОДЕВИЙ

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

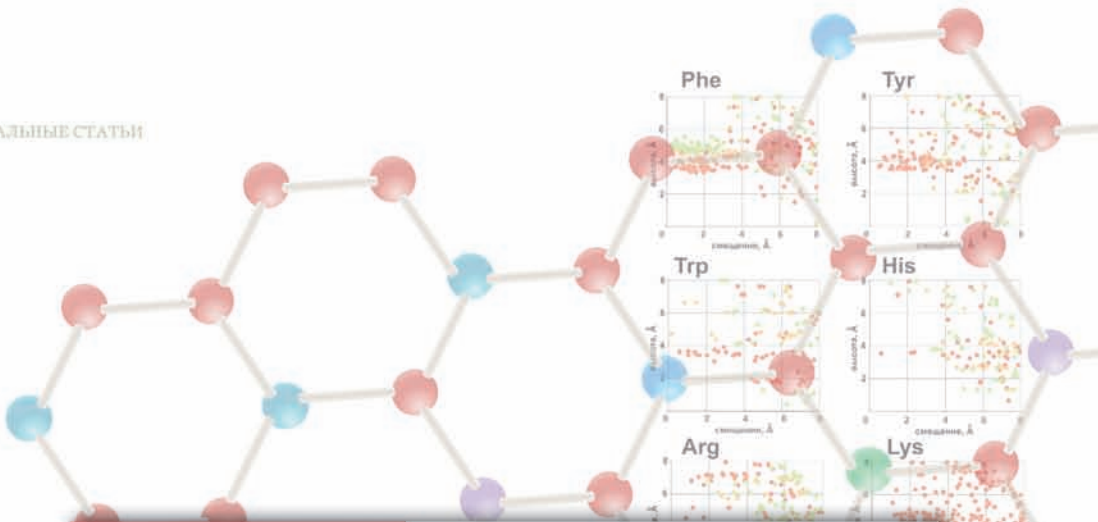
Динамизм этих параметров, определяющий наличие или отсутствие стэжинга, до сих пор остается не выясненным и в оценочных критериях выбирается достаточно произвольно [6, 7]. Его уточнение могло бы повысить эффективность оценки качества и достоверности структур белок-лиганд, представляемых методами молекулярного 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.

Известный пример стэжинг-взаимодействий – параллельная упаковка азотистых 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 ампициллов в белках [7, 10] и в модельных системах, состоящих из простых углеводородов – бензола, нафталина [11–14]. Кроме того, такие соединения имеют тенденцию участвовать в π - π катионном взаимодействии, при котором образуется контакт между положительно заряженными группами и π -электронным облаком [15–17].

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

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

Рис. 1. Геометрические параметры, в функции которых описаны стэжинг-взаимодействия между двумя ароматическими кольцами: сдвиг d и высота h (0) центра одного из колец относительно другого; угол α между нормальными к плоскостям колец



АПРЕЛЬ-ИЮНЬ 2009 № 1

ActaNaturae

НЕПРИРОДНЫЕ АНТИТЕЛА
ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

РЕГУЛЯЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗЫ В ОНКОГЕНЕЗЕ
СТР. 54

СТРУКТУРА МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ВОЗБУДИТЕЛЯ ОПИСТОРХОЗА
СТР. 69

СТЭЖИГ-ВЗАИМОДЕИЯ В КОМПЛЕКСАХ БЕЛКОВ С АДЕНИН- И ГУАНИН-