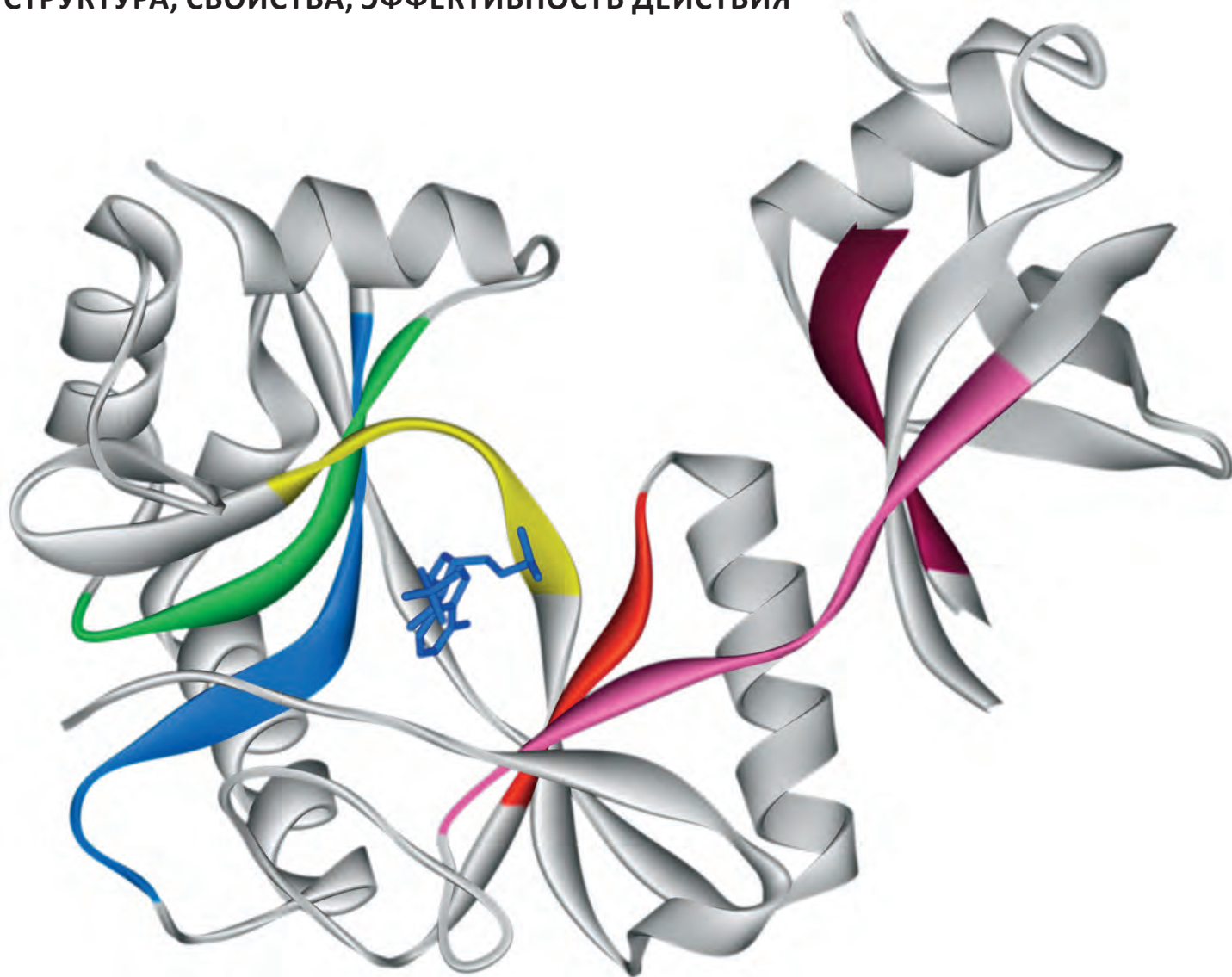


# Acta Naturae

## ДНК-ЗАВИСИМЫЕ ФЕРМЕНТЫ

СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ



ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЦИОНАЛЬНОЙ  
ФАГОВОЙ ТЕРАПИИ

СТР. 66

СИСТЕМА КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ  
ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

СТР. 80

НОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ РОСТА МИКОБАКТЕРИЙ

СТР. 115

МЕХАНИЗМЫ ФИНАНСИРОВАНИЯ  
ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ НАУК О ЖИВОМ  
В РОССИИ

СТР. 6

# Письмо редакторов

**В**ашему вниманию предлагается очередной, четвертый номер журнала Acta Naturae. В скором времени нам будет год, и можно подвести некоторые итоги. По откликам коллег из России и из-за рубежа интерес к нашему изданию растет. Двухязычный формат делает издание доступным для зарубежного читателя. Мы старались обеспечить сбалансированность в представлении статей в фундаментальной области и статей методических. Ряд опубликованных обзоров вызвали повышенный интерес. Мы также надеемся, что материалы, опубликованные в разделе «Форум», нашли своего читателя. Мы не можем с уверенностью утверждать, что достигли совершенства, и в этой связи любые ваши замечания и предложения будут важны для нас.

В предлагаемом томе мы публикуем обзор, отражающий новую концепцию роли кальциевой сигнализации в развитии нейродегенеративных процессов. Заслуживают внимания статьи в области энзимологии, посвященные медицинским аспектам биокатализа.

Раздел «Форум» посвящен проблемам финансирования отечественной науки. Мы надеемся получить отклики на представленные публикации и считаем, что представленный материал позволит российским ученым, а также нашим соотечественникам, работающим за рубежом, лучше ориентироваться в особенностях российской системы грантов. ●

**Редакционная коллегия**



# Конкурс фотографии

## НАУКА – ЭТО КРАСИВО!

+ ВИКТОРИНА, ЭКСКУРСИИ, ФОТОСЕМИНАРЫ

Контакты: +7 (495) 930-8707, 930-8850, photo@strf.ru, [www.strf.ru](http://www.strf.ru)



При поддержке  
Министерства  
образования и науки России,  
Федерального агентства  
по науке и инновациям,  
МГУ имени М.В. Ломоносова

Главный спонсор



Телекоммуникационный партнер



Билайн™

Коммерческий партнер



Генеральный информационный партнер



Генеральный интернет-партнер



Партнер



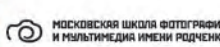
Специальный партнер



PHOTOGRAPHER.RU



DigitalPhoto

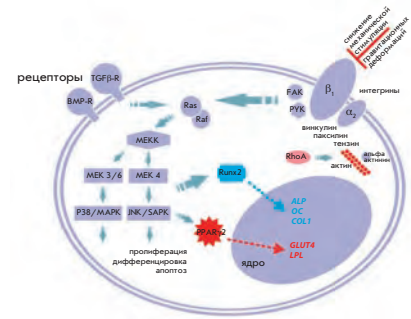




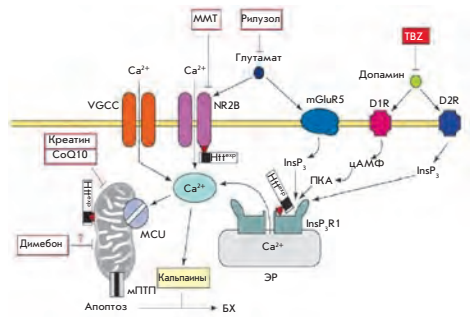
Л.Б. Буравкова, П.М. Гершович, Ю.Г. Гершович, А.И. Григорьев

## Механизмы гравитационной чувствительности остеогенных клеток-предшественников

В обзоре представлен подробный анализ современных данных о механической и гравитационной чувствительности остеобластов и остеогенных клеток-предшественников *in vitro*



Молекулярная регуляция пролиферации и дифференцировки ММСК в зависимости от требований «внешнего механического поля»



Модель кальциевой дисрегуляции при болезни Хантингтона

И.Б. Безprozванный

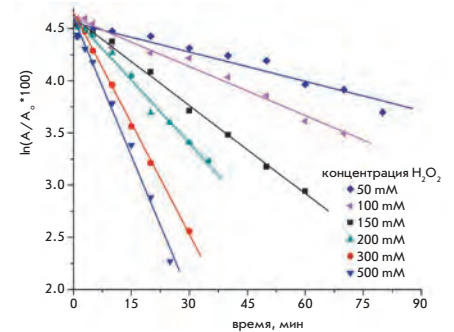
## Система кальциевой сигнализации при нейродегенерации

В данном обзоре приведено обсуждение результатов в поддержку кальциевой гипотезы нейродегенеративных заболеваний. Согласно ней, атрофические и дегенеративные процессы в нейронах пациентов с болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона, амиотропным латеральным склерозом, болезнью Хантингтона, и спинномозговыми атаксиями сопровождаются изменениями кальциевого гомеостаза

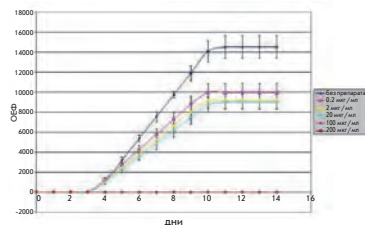
С.С. Савин, В.И. Тишков

## Инактивация пероксидом водорода как метод оценки стрессовой стабильности форматдегидрогеназы *in vivo*

Полученные в работе данные подтверждают гипотезу, что ФДГ, синтез которых возрастает в стрессовых условиях, должны обладать высокой стабильностью против инактивации пероксидом водорода, причем эта стабильность тем выше, чем более сильным стрессовым воздействиям подвергается клетка. Данные по инактивации очищенных препаратов ФДГ пероксидом водорода могут быть использованы для сравнительной оценки стрессовой стабильности форматдегидрогеназ *in vivo*



Инактивация PseFDH с заменой Cys255Ala в присутствии различных концентраций пероксида водорода



Данные эксперимента по проверке антимикробной активности одного из аналогов пиримидиновых нуклеозидов

Л.А. Александрова, Э.Р. Шмаленюк, С.Н. Кочетков, В.В. Ерохин, Т.Г. Смирнова, С.Н. Андреевская, Л.Н. Черноусова

## Новые 5-модифицированные пиримидиновые нуклеозиды – ингибиторы роста микобактерий

Настоящая работа посвящена изучению способности новых аналогов пиримидиновых нуклеозидов ингибировать рост *M. tuberculosis*. Показано, что 2'-дезоксиде-, 3'-азидо-2',3'-дидезокси- и 3'-амино-2',3'-дидезокси-производные уридина и цитидина, содержащие в 5-м положении основания протяженные метилоксиалкильные заместители, способны ингибировать рост культуры микобактерий *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro*

## Учредители:

Федеральное агентство по науке и инновациям РФ,  
Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова,  
ООО «Парк-медиа»

## Редакционный совет:

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

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

## Редакционная коллегия:

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

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

*Директор по стратегическому развитию:*  
Е.Л. Пустовалова

*Руководитель проекта:* Р.Р. Петров  
*Выпускающий редактор:* Е.В. Дорогова  
*Научный редактор:* В.В. Сычев

*Подготовка иллюстраций и верстка:* К.К. Опарин  
*Корректурa:* М.В. Чуланова  
*Дизайн-проект:* Х. Шнайдер

Адрес редакции: 119991, Москва, Ленинские горы,  
Научный парк МГУ, владение 1, строение 75Г.  
Телефон/факс: +7 (495) 930 80 06.  
E-mail: knorrevd@gmail.com, rpetrov@strf.ru, vsychev@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, 2009

Номер подписан в печать 15 марта 2010 г.  
Тираж 600 экз. Цена свободная.  
Отпечатано в типографии «МЕДИА-ГРАНД»

Дорогие читатели! ..... 1

## ФОРУМ

В.В. Сычев  
**Программа «Молекулярная и клеточная  
биология» Президиума РАН –  
эффективный формат поддержки  
сильных научных групп..... 6**

М.А. Муравьева  
**Федеральные целевые программы:  
адресное финансирование  
приоритетов в науке и технике ..... 10**

И.А. Стерлигов  
**РФФИ: тревожное будущее главного  
грантового фонда ..... 16**

А.И. Григорьев  
**Программа фундаментальных  
исследований Президиума РАН  
«Фундаментальные науки – медицине» ... 22**

## ОБЗОРЫ

Л.Б. Буравкова, П.М. Гершович, Ю.Г. Гершович,  
А.И. Григорьев  
**Механизмы гравитационной  
чувствительности остеогенных  
клеток-предшественников ..... 30**

О.А. Виноградова, Д.В. Пышный  
**Селективность ферментативного  
превращения олигонуклеотидных  
зондов при анализе нуклеотидных  
полиморфизмов ДНК ..... 40**

Е.С. Стародубова, М.Г. Исагулянц, В.Л. Карпов  
**Регуляция процессинга иммуногена:  
 сигнальные последовательности  
 и их использование для создания  
 нового поколения ДНК-вакцин . . . . . 59**

А.В. Летаров, А.К. Голомидова, К.К. Тарасян  
**Экологические основы  
 рациональной фаговой терапии . . . . . 66**

И.Б. Безprozванный  
**Система кальциевой сигнализации  
 при нейродегенерации . . . . . 80**

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А.С. Исаева, Е.Е. Куликов, К.К. Тарасян, А.В. Летаров  
**Новый метод высокоразрешающего  
 геномного ПЦР-фингерпринтинга  
 энтеробактерий . . . . . 89**

О.А. Патутина, Н.Л. Миронова, Е.И. Рябчикова,  
 Н.А. Попова, В.П. Николин, В.И. Каледин, В.В. Власов,  
 М.А. Зенкова  
**Противоопухолевое и антиметастатическое  
 действие РНКазы А и ДНКазы I . . . . . 95**

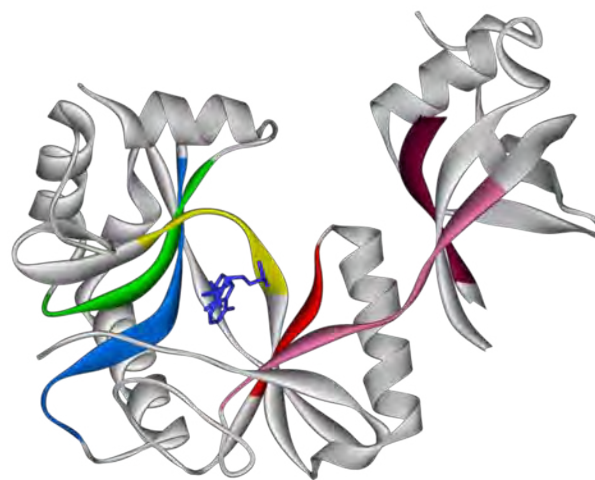
Д.Ф. Гуранда, Г.А. Ушаков, В.К. Швядас  
**Эффективное и стереоселективное  
 ацилирование 1-фенилэтиламина  
 в водной среде без активации  
 ацильного донора, катализируемое  
 пенициллинацилазой . . . . . 101**

С.С. Савин, В.И. Тишков  
**Инактивация пероксидом водорода  
 как метод оценки стрессовой стабильности  
 формиадегидрогеназы *in vivo* . . . . . 104**

Т.М. Астахова, Г.В. Делоне, Ю.В. Люпина,  
 Е.Б. Абрамова, И.В. Урываева, Н.П. Шарова  
**Изменение пула протеасом в процессе  
 злокачественной трансформации  
 клеток печени мыши . . . . . 109**

Л.А. Александрова, Э.Р. Шмаленюк, С.Н. Кочетков,  
 В.В. Ерохин, Т.Г. Смирнова, С.Н. Андреевская,  
 Л.Н. Черноусова  
**Новые 5-модифицированные  
 пиримидиновые нуклеозиды –  
 ингибиторы роста микобактерий . . . . . 115**

М.М. Шмаров, Е.С. Седова, Л.В. Верховская,  
 И.А. Руднева, Е.А. Богачева, Ю.А. Барыкова,  
 Д.Н. Щербинин, А.А. Лысенко, И.Л. Тутыхина,  
 Д.Ю. Логунов, Ю.А. Смирнов, Б.С. Народицкий,  
 А.Л. Гинцбург  
**Индукция протективного  
 гетеросубтипического иммунного  
 ответа против вируса гриппа  
 при иммунизации рекомбинантными  
 аденовирусными векторами,  
 экспрессирующими гемагглютинин  
 вируса гриппа H5 . . . . . 119**



#### РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ

Пространственная структура и доменная организация ДНК-лигазы *Chlorella virus* в аденилированном состоянии. Отдельные мотивы выделены разными цветами. Изображение получено с использованием структуры 1FV1

# Программа «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН – эффективный формат поддержки сильных научных групп

В.В. Сычев, *Acta Naturae*

В России существуют разные способы финансирования научной деятельности, от государственных до частных, выделяющих на работу исследователей от десятков тысяч до миллионов рублей в виде стипендий и грантов. Один из главных вопросов, звучащих в адрес руководителей того или иного фонда или ведомства, – насколько прозрачен и объективен выбор тех коллективов, которые в итоге получают поддержку? Мало кто из числа известных финансирующих организаций избежал подобных упреков в свой адрес.

Тем не менее в российской науке есть одна программа поддержки ученых, которая заслужила право считаться одной из наиболее открытых и объективных среди подобных. Речь идет о программе «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН, обычно называемой Георгиевской – по фамилии ее координатора, академика РАН Георгия Георгиева. По признанию многих специалистов, ничего лучше этой программы до сих пор у нас в стране не создано.

Программа существует восьмой год – с тех пор, как Президиум РАН начал эксперимент по поддержке наиболее сильных научных коллективов крупными по тем временам грантами. Идея руководства академической науки состояла в том, чтобы финансово поддерживать лидеров нашей науки и постараться приблизить условия их работы к условиям в зарубежных лабораториях.

Речь шла именно об отдельных группах и лабораториях, но не об институтах в целом – понятно, что в каждом институте есть лаборатории успешные и не слишком, поэтому разумно тратить деньги на поддержку доказавших свой высокий уровень специалистов.

Был еще один аргумент в пользу начала такого эксперимента: на Западе на науку тратятся средства гораздо большие, чем в России, поэтому сохранить научный потенциал и удержать талантливые головы (особенно молодые) можно, создав сравнительно комфортные в финансовом плане условия для работы ученых. При этом предлагалось предоставить руководителям научных подразделений возможность расходовать деньги как на избира-

тельную выплату достаточно высоких зарплат, так и на приобретение необходимого оборудования и материалов для проведения научной работы.

С чего же строить новую систему поддержки науки? Ее создатели понимали, что надо обязательно избежать повторения ситуации со сметным финансированием научных институтов. Дело в том, что, во-первых, распределение денег между научными организациями определялось довольно произвольно. Во-вторых, внутри самой организации выделенные деньги полностью контролировались администрацией. Оба этих обстоятельства выглядели неприемлемыми.

Но ключевым вопросом был традиционный для всех конкурсов – кому и как отбирать научные подразделения, заслуживающие поддержки.

В разных областях науки есть достаточно объективные критерии для такого отбора. Это наукометрические параметры: импакт-фактор (ИФ) журнала, где публикуется автор, и индекс цитирования (ИЦ). Индекс цитирования показывает, насколько часто на статью потом ссылаются другие исследователи, т.е. насколько

существенный информационный след она оставила. Конечно, на этот показатель влияет много случайных факторов, и он нередко искажает реальное соотношение «силы» статьи. В свою очередь, импакт-фактор показывает, сколько раз за год в среднем цитируется опубликованная в журнале статья (тем самым возникла иерархия научных журналов). Чем выше ИФ журнала, тем более высокие требования предъявляются к публикуемым в нем статьям, тем труднее в нем опубликоваться и тем более ценится работа, опубликованная в таком издании. Жесткое рецензирование статей в таких журналах – фактически та международная экспертиза научных работ, о которой так много говорят.

Один из наиболее ярких примеров области науки, в которой наукометрические данные можно применить для объективной оценки «силы» того или иного автора или коллектива – физико-химическая биология, главная составляющая современных наук о живом. Поэтому для поддержки ученых в этой области и было решено создать программу Президиума



РАН, которая поначалу так и называлась – «Физико-химическая биология» (в 2006 г. название поменялось на «Молекулярная и клеточная биология» (МКБ), а координатором программы стал академик РАН Георгий Георгиев.

«У нас есть три типа конкурсов, – объясняет Георгий Георгиев принципы распределения средств. – Один конкурс – это чисто фундаментальные исследования, второй – фундаментальные социально ориентированные работы. Они направлены на решение важных практических задач, но окончательный результат остается непредсказуемым, как при любом

фундаментальном исследовании. Наконец, третий конкурс – образование и поддержка так называемых новых групп».

Новые группы – это особая часть программы. Нередки случаи, когда в составе какой-либо лаборатории выделяется яркий и продуктивный молодой исследователь, стремящийся к независимости и реализации собственных идей. Он может договориться с руководством любого института РАН о том, что в случае выигрыша им гранта по конкурсу МКБ на новые группы ему будет предоставлено место для работы и ставка (ставки) в институте. В этом случае, по существу,

речь идет о поддержке кадрового резерва (или, если угодно, «точек роста» в науках о живом). Этот тип конкурса открыт и для наших соотечественников за рубежом, но без всяких для них поблажек. Кстати, в программе есть требование, чтобы руководитель проекта проводил в российской лаборатории не менее девяти месяцев в году – а это не что иное, как реальная реэмиграция ученого.

Количество денег, выделяемых на отдельные проекты, варьирует в зависимости от типа конкурса. До недавнего времени фундаментальные и фундаментально-ориентированные работы ежегодно получали до 4 мил-

### КОММЕНТАРИИ СПЕЦИАЛИСТОВ

#### Арсений Капрельянц: «Уникальность программы Георгиева – в ее открытости»

**Капрельянц Арсений Сумбатович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией биохимии стрессов микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, руководитель проекта «Метаболические пути реактивации латентного туберкулеза».**

Программа, которую координирует академик РАН Георгий Георгиев, уникальна. Подобных ей нет. Уникальность ее – прежде всего в объективности и прозрачности системы экспертизы. Конечно, достаточно объективная экспертиза есть в других программах, но там нет прозрачности. Заявитель не знает, по каким причинам ему отказывают в гранте, а другой выигрывает.

В Программе «Молекулярная и клеточная биология» все формализовано, но ты знаешь правила игры. На мой взгляд, в наших условиях это правильно. Когда нет объективной оценки, в нашей стране начинаются всякие коллизии, не связанные с наукой, вступают в силу субъективные факторы.

**Как Вы полагаете, полезен ли опыт организации Георгиевской программы для поддержки других направлений научных исследований?**

Да, полагаю, что в нашей российской ситуации в настоящее время это полезно. Многие критерии экспертизы могли бы быть использованы и в других программах РАН. Возможно, не везде они будут решающими, но все-таки открытость, прозрачность должны присутствовать.

**Каковы Ваши главные достижения, что сделано благодаря гранту по Программе Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология»?**

Еще до участия в этой программе мы вместе с британскими учеными из Уэльского университета открыли семейство белков RPF (от английского resuscitation promoting factor – «фактор, ускоряющий оживление»). Это такие белки, которые секретируются разными бактериями (в том числе микобактериями – возбудителями туберкулеза). Они пробуждают покоящиеся бактерии от спячки, провоцируют их переход из латентного состояния в активное. Это было важное открытие, и мы стали разрабатывать тему. Кроме того, что мы обнаружили такие белки, мы тогда

ничего другого о них не знали: как они работают, какой механизм их действия?

В рамках Программы достигнут один из важнейших результатов – мы выяснили, что эти белки являются на самом деле ферментами, которые расщепляют определенные звенья в бактериальной клеточной стенке. По существу, мы подобрались к пониманию того, как эти белки функционируют.

Возникла такая идея. Мы знаем, что покоящиеся формы бактерии имеют утолщенную клеточную стенку наподобие спорообразующих бактерий. Белки RPF, по-видимому, расщепляют определенные связи в этой клеточной стенке, ее разрывают – и тогда начинается активное размножение, иначе эта «шуба» не дает клетке просто разделиться. Благодаря гранту мы описали этот механизм, результаты опубликовали в публичных изданиях.

Вторым важным достижением явилось экспериментальное доказательство важности белков семейства RPF в развитии туберкулезного процесса на лабораторных животных. Совместно с нашими коллегами из Южной Африки мы исследовали поведение штаммов *M.tuberculosis* с инактивированными генами RPF (всего 5 штук). Нокаут не менее трех из пяти RPF-генов привел к снижению вирулентности штаммов *M.tuberculosis* на животных. Кроме того, обнаружилась неспособность оживления этих штаммов из покоящегося состояния *in vitro*. Инактивация четырех генов RPF привела к практически полной потере вирулентности таких штаммов. Отсюда возникла идея: а не взять ли это за основу вакцинации, поскольку авирулентный штамм уже не опасен, а иммунный ответ может быть сильным. Мы можем приготовить соответствующий штамм в лабораторных условиях – в пробирке, и попытаться вакцинировать лабораторных животных. Что и было сделано с помощью наших коллег из ЦНИИ туберкулеза РАМН.

Выяснилось, что такие штаммы обладают действительно высокой защитной активностью. Мы сначала вакцинировали мышей, а потом заражали их активным туберкулезом. И большинство мышей выживало! То есть была достигнута достаточно высокая эффективность вакцинации, не хуже, а может быть, даже лучше, чем известная вакцина БЦЖ. Таким образом, как результат работы по Георгиевскому гранту мы можем предложить перспективное направление.

**Анна Горбатова, STRF.ru, специально для Acta Naturae**



## Юлия Кравченко: «Я почувствовала, что и в России можно успешно заниматься наукой»

**КРАВЧЕНКО Юлия Евгеньевна** — кандидат биологических наук, руководитель группы регуляции транскрипции генома Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, руководитель проекта «Изучение функций ядерной РНК-полимеразы spRNAP-IV и систем обеспечения стабильности генома» (новая группа).

**Юлия Евгеньевна, как была создана Ваша группа и какие результаты получены в рамках работы по Программе «Молекулярная и клеточная биология»?**

Предпосылкой к созданию новой группы стало открытие новой, четвертой ядерной РНК-полимеразы эукариот (так называемой spRNAP-IV, от английского single-polypeptide RNA polymerase IV). На эту тему мною в 2004 году была защищена кандидатская диссертация, на следующий год я подала заявку на участие в конкурсе «Новые группы» Программы МКБ и получила грант на работу вновь создаваемого научного подразделения.

Основная тема работы нашей группы — изучение процессов транскрипции. Надо выяснить, какие транскрипционные факторы принимают участие в работе новой ядерной РНК-полимеразы, какова структура транскрипционного комплекса, какие гены транскрибируются этой полимеразой, каковы их регуляторные элементы.

Нам удалось частично установить компоненты транскрипционного комплекса. Это два из трех транскрипционных факторов митохондриальной РНК-полимеразы. Дело в том, что РНК-полимераза IV — продукт альтернативного транскрипта гена *POLRMT* митохондриальной РНК-полимеразы. Мы установили, что два из трех транскрипционных факторов могут находиться в ядре, а также показали существование прямого комплекса новой полимеразы с этими факторами. Другими словами, митохондриальная РНК-полимераза и РНК-полимераза IV делят между собой транскрипционные факторы. И сейчас мы работаем над тем, чтобы выяснить, каким образом происходит «распределение» транскрипционных факторов: имеет ли место конкурентный механизм или переключение с одних белков на другие?

Что касается того, какие гены транскрибируются четвертой РНК-полимеразой, то мы идентифицировали более 50 таких генов. Впрочем, какой-то общей для них функции пока не выявлено. Одни гены связаны с метаболизмом (в частности, гликолизом у млекопитающих и у дрожжей), другие — с перестройкой гетерохроматина, ДНК-репарацией, белками теплового шока, поддержанием статуса метилирования и т.п. Кроме того, наши данные показывают, что новая РНК-полимераза транскрибирует гены, продукты которых связаны с работой сигнальных путей, в частности сигнального пути белка-онкосупрессора p53. Таким образом, по функциональной вовлеченности spRNAP-IV транскрибируемых генов уже сейчас можно делать выводы о ее роли в различных процессах поддержания жизнедеятельности организма. Важно также отметить, что обнаружилась очень большая общность в регуляторных областях всех найденных генов. Нами открыт функциональный мотив в составе промоторов всех отобранных генетических последовательностей, который не встречается в промоторах генов, транскрибируемых другими РНК-полимеразами. Примечательно, что этот уникальный консервативный мотив был обнаружен у всех млекопитающих.

Еще одно направление, по которому наша группа работает в рамках Программы «Молекулярная и клеточная биология», — исследование системы антиоксидантной защиты клеточного генома. Здесь мы работаем совместно с Лабораторией пролиферации клетки, возглавляемой Петром Михайловичем Чумаковым. Несколько лет назад в лаборатории Петра Михайловича был открыт белок сестрин-2 — один из трех белков семейства сестринов, активируемых белком p53 и играющих ключевую роль в процессах

защиты клетки от действия избыточных концентраций активных форм кислорода. В частности, нами было установлено, что сестрины вместе с белком сульфоредаксином принимают участие в восстановлении окисленных форм еще одного компонента антиоксидантной защиты клетки — белка пероксиредаксина.

До недавнего времени не было комплексного восприятия работы системы антиоксидантной защиты, а имелись только разрозненные данные о функционировании отдельных белков. Однако мы впервые показали существование единого мультикомпонентного антиоксидантного белкового комплекса, включающего в свой состав и сестрины, и сульфоредаксин, и тиоредаксинредуктазу, а также ряд других белков, обнаруженных нами. Любопытно, что в клетке сборка этого комплекса происходит исключительно в ответ на окислительный стресс. Причем если в норме компоненты антиоксидантного комплекса располагаются в цитоплазме клетки, то в стрессовой ситуации весь комплекс собирается и направляется в ядро, где выполняет свою главную функцию — защиту геномной ДНК от окисления. Мы также показали, что этот процесс протекает не без контроля белка p53, где он выполняет свою функцию «стража генома», предотвращая повреждение молекулы ДНК.

**Как Вы себя ощущаете в качестве руководителя молодого научного подразделения?**

После того как я несколько лет в рамках совместного проекта проработала в США, написала и защитила диссертацию, у меня возник выбор — дальше искать работу за границей или же оставаться здесь. Но уезжать из России, честно говоря, не хотелось. Хотя для работы в науке за рубежом созданы все условия, вплоть до бытовых. И в этот момент я узнала о возможности принять участие в Программе МКБ. Дай, думаю, попробую подать заявку — а в результате выиграла грант. Первый год был в большей степени организационный. На полученные деньги мы сделали ремонт в новых лабораторных комнатах, выделенных нашей группе Институтом, закупили оборудование, реактивы. Конечно, как руководителю, мне пришлось вникать в самые разные оргвопросы, в частности, разбираться в весьма своеобразной российской системе закупок реактивов и оборудования. В этот первый, наиболее сложный год в плане науки наша группа «выехала» в основном за счет заделов, созданных чуть раньше. Но зато я почувствовала, что и в России можно успешно заниматься наукой, и настрой у меня стал совсем иным, гораздо более оптимистичным.

Более того, участие в Программе МКБ не только дает возможность эффективно работать над научными задачами, но и поддерживает людей в житейском плане. За счет гранта МКБ можно платить такую зарплату сотрудникам, чтобы они не искали дополнительного заработка на стороне. В итоге удалось создать вполне комфортные условия для научного творчества.

Сейчас в составе моей группы, помимо меня, трудятся один кандидат наук (сделавший работу и защитивший уже на базе новой группы), три аспиранта и два студента. Помимо этого, я с завидной регулярностью получаю письма от студентов с просьбой поступления к нам в аспирантуру или предоставления возможности работать над дипломом. Сейчас подумываю над тем, чтобы взять еще одну дипломицу, для нее есть интересная работа.

Так что эта Программа — хороший старт для молодых амбициозных специалистов. Вдобавок она — очень хороший стимул к дальнейшему профессиональному росту, потому что темпы работы в рамках гранта МКБ таковы, что ты не можешь позволить себе расслабиться. Необходимость соответствовать требованиям Программы придает силы и держит в тонусе (это, прежде всего, касается получения результатов, которые публикуются в престижных журналах). Впрочем, основным движущим фактором остается научный интерес, поскольку без него невозможно добиться успеха.

**Владимир Сычев**

лионов рублей в течение пяти лет (но если работа чисто теоретическая, то количество денег, выделяемых на нее, существенно меньше). Новые группы на трехлетний срок были вправе рассчитывать на два миллиона ежегодно. «Конечно, эти суммы были очень хороши семь лет назад, но сегодня на фоне непрерывной инфляции они требуют удвоения», – считает Георгий Георгиев.

Вместо этого в 2010 году финансирование Программы уменьшилось почти на треть (на 29 %); соответственно, пропорциональным образом уменьшились суммы, выделяемые на проекты в рамках каждого из трех типов конкурсов. Это сразу поставило программу на грань краха, так как был утрачен основной ее смысл – адекватная поддержка сильных научных групп. Сразу после этого начался новый цикл эмиграции молодых кадров (кандидатов наук) из ряда сильных лабораторий.

Как же происходит процедура отбора заявок? Существует Научный совет программы, составленный из активно работающих академиков. Функция совета – утверждать общие правила отбора. Он же выбирает из своего состава Экспертную комиссию из семи человек, которая организует конкурс, но ее роль в принятии решения минимальна. Программа должна быть предельно автоматизирована и не зависеть от личности координатора или кураторов.

Начальный этап любого конкурса МКБ – сбор заявок и их обработка техническими группами по два-три человека из разных институтов. Результатом становятся сводные таблицы, отражающие объективные показатели эффективности работы лаборатории или (в случае новых групп) индивидуальных ученых.

Основное значение придается суммарному ИФ публикаций за последние пять лет с учетом вклада лаборатории в каждую из публикаций, а также ИФ из расчета на одного сотрудника.

При оценке заявок, помимо наукометрических показателей, используются и другие критерии, которым должны соответствовать заявители. Это и наличие знаков признания коллектива российским и зарубежным научным сообществом (различные

премии и звания), и возрастной состав участников работы (особое внимание уделено молодежи и среднему звену в возрасте до 45 лет). В расчет берется подготовка кадров в коллективе, обладание патентами.

Итоговые таблицы публикуются на страницах интернет-сайта Программы (каждый заявитель может проверить их правильность). Заявки, имеющие особо высокие объективные показатели (прежде всего, импакт-фактор публикаций), автоматически становятся победителями (таковых, как правило, оказывается около трети всех победителей). Задача Экспертной комиссии – проверить, чтобы при этом не было нарушений (например, в список публикаций не засчитывались работы фактически эмигрировавших сотрудников). Примечательно, что заявки с участием членов Экспертной комиссии в число победителей первого тура попасть не могут, чтобы не вызывать вопросов об объективности их оценки.

Победители первого тура и сильные (с наибольшими баллами) победители предыдущих конкурсов составляют «верхний слой», которому передаются функции независимой экспертизы. Каждая из оставшихся заявок получает по пять независимых отзывов заведомо сильных и лично не заинтересованных в их оценке ученых.

«Мы этому «верхнему слою» даем на рассмотрение все не прошедшие в первом туре заявки и заявки Экспертной комиссии, – поясняет Георгий Георгиев. – Эксперты могут несколько менять оценку по объективным показателям. Например, мы повысили балл человеку, который имеет очень хорошие работы, но очень плох в английском языке. Ему трудно публиковаться за рубежом, но эксперты знают истинный уровень работ – и повышают балл. Есть иной пример: человек, работающий за границей, но уже не имеющий прочных связей с Россией и никакой пользы для российской науки не приносящий. Но он продолжает числиться в своем бывшем институте у нас в стране, и его работы формально засчитываются лаборатории, подавшей заявку. Такие вещи эксперты тоже выявляют».

Особенно тщательно рассматриваются социально ориентированные

заявки, где, кроме оценки силы коллектива, оценивается масштабность (значимость), оригинальность и реалистичность проекта. После проведения экспертизы ее данные приплюсовываются к объективным показателям. Далее Экспертная комиссия выносит окончательный вердикт, который может лишь слегка отличаться от объективных показателей и рекомендаций экспертов.

Результаты оценки и заключение немедленно публикуются, и автор заявки может ознакомиться с заключениями экспертов (по требованию) и подать жалобу в Экспертную комиссию или специальный Контрольный совет, состоящий из академиков, не работающих в системе РАН или в ее Центральном регионе. И в ряде случаев приходилось пересматривать первоначальные решения.

«Как распределяются средства? Обычно нашу программу сверху ограничивают в объеме денег на зарплату – видимо, это соответствует общим академическим расходам, – говорит Георгий Георгиев. – На 2010 г. нам было предписано, что эта сумма должна составить 50–55 % от общего объема денег. Все на усмотрение руководителя подразделения. Заведующий лабораторией и ее сотрудники полностью отвечают за результат: если она по публикациям окажется «в нулях» в течение пяти лет, или же нарушаются правила программы, то мы прекращаем финансирование».

«Молекулярная и клеточная биология» уже доказала свою состоятельность: косвенным образом успешность семилетней работы программы подтверждается тем, что почти все научные коллективы, работающие на ее средства, – действительно топовые специалисты в сфере живых систем в России. Конечно, с процедурой распределения средств по программе «Молекулярная и клеточная биология» можно соглашаться или нет, но подавляющее большинство специалистов у нас в стране признают, что ничего лучше не придумано. Если другие области науки в России обретут похожие механизмы поддержки, то это можно будет только приветствовать. ●

# Федеральные целевые программы: адресное финансирование приоритетов в науке и технике

М.А. Муравьева, STRF.ru, специально для Acta Naturae

Федеральные целевые программы – один из важнейших инструментов реализации государственной политики, направленной на переход российской экономики к инновационному типу развития. Развитие научно-технологического комплекса страны поддерживается, в частности, благодаря реализуемой в настоящее время ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2012 годы». В настоящее время происходит реорганизация ее главного государственного заказчика – Федерального агентства по науке и инновациям, и данная ФЦП перейдет в ведение Министерства образования и науки России. Тем не менее суть целевой программы поддержки российского научно-технологического комплекса не изменится. Об идеологии, структуре, механизмах управления программы рассказали руководители Федерального агентства по науке и инновациям.

**Ф**едеральные программы разрабатываются с учетом приоритетов и целей социально-экономического развития страны, направлений структурной и научно-технической политики, результатов прогноза развития общегосударственных потребностей и ресурсов, динамики внешнеполитических и внешнеэкономических условий. Несмотря на различия в специфике объектов федеральных программ, их объединяет концентрация средств на приоритетных направлениях и адресность финансирования. Все программы утверждаются Правительством РФ и подчиняются определенным целям, которые отражают государственную политику в той или иной сфере. Финансовые ресурсы поступают преимущественно из федерального бюджета (остальные источники финансирования — бюджеты регионов и внебюджетные источники имеют гораздо

меньший объем). ФЦП представляют собой увязанный по задачам, ресурсам и срокам осуществления комплекс научно-исследовательских, опытно-конструкторских, производственных, социально-экономических и организационно-хозяйственных мероприятий, обеспечивающих эффективное решение системных проблем в области государственного, экономического, научного, социального и культурного развития страны. В 2010 году в России реализуется 54 федеральных целевых программы самой разнообразной направленности с общим объемом финансирования в 801.7 млрд рублей. Объем бюджетного финансирования ФЦП, направленных на развитие высоких технологий, в этом году сохранится на уровне 2009-го и составит около 250 млрд рублей. По ФЦП «Исследования и разработки...» запланировано 7364.05 млн рублей, в том числе на проведение НИ-

ОКР – 6656.33 млн рублей. Все ФЦП объединяет конкурсный характер заключения контрактов на выполнение программных проектов.

С 2002 года в России действует ФЦП по развитию научно-технологического комплекса страны (в 2002–2006 гг. – «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники», далее – «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы»). Это единственная программа, построенная по научно-техническим приоритетам. Всего их выделено пять: информационно-телекоммуникационные системы, индустрия наносистем и материалов, рациональное природопользование, живые системы, энергетика и энергосбережение.

«Отличительная особенность программы – мультидисциплинарность, а также реализация всей инновационной цепочки: от генерации знаний до коммерциализации разработок, – отмечает руководитель Федерального агентства по науке и инновациям (Роснауки) **Сергей Мазуренко**. – Впервые в национальной программе была полностью сформулирована инновационная цепочка, а также поставлены задачи, связанные с созданием инновационной и научно-исследовательской инфраструктуры. Сегодня по этой программе уже имеются значимые результаты у НИИ, вузов и, что особенно важно, предприятий малого и среднего бизнеса. Для всех очевидно: если мы не будем развивать инновационный бизнес, не будем создавать инновационную экономику, то зайдем в тупик – запасы нефти и газа имеют тенденцию заканчиваться».

Изначально в программу была заложена идея отработки механизмов частно-государственного партнерства,



**ЭКСПЕРТНЫЕ МНЕНИЯ**

**Вартапетов Сергей Каренович, директор Центра физического приборостроения Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН, кандидат физико-математических наук**

**Как один из участников ФЦП «Исследования и разработки», считаете ли Вы эту программу эффективным инструментом поддержки и развития науки?**

– Как инструмент, я считаю, ФЦП очень эффективна, но в любом инструменте бывают какие-то неполадки, поэтому эту систему надо совершенствовать и улучшать. Допустим, программа предполагает быстрый выход на коммерциализацию. При этом совершенно не учитывается специфика работ, которые проводятся по направлению «Живые системы». Если даются деньги на создание медицинской техники или фармацевтических препаратов, то к коммерциализации нельзя приступить через 2–3 года после начала исследований. Необходимо провести фазы клинических, медицинских, технических испытаний, и на это тоже нужно время. А ФЦП построена так, что, закончив ОКР, я сразу должен приступить к коммерциализации. Это ошибочное утверждение. Надо бороться с этим непониманием. Если какой-то коллектив ученых сразу после завершения проекта приступил к коммерциализации, значит, для участия в ФЦП он предложил старую разработку. Я могу об этом смело заявлять.

На создание высокотехнологичной продукции требуется около 2–3 лет, а если речь идет о медицинской технике, то еще как минимум год-полтора на проведение испытаний. Так что цикл рождения нового медицинского изделия занимает около пяти лет. А издержки ФЦП в том, что программа не учитывает всех этих особенностей, в результате происходит несоответствие требований и обязательств исполнителя.

**Каким образом государство должно принципиально строить систему поддержки науки: в каких вопросах устраниваться, а в каких — играть роль активного агента?**

– Мне кажется, в данном случае все достаточно ясно. Как и во всем мире: в НИОКРовские фазы, особенно НИРовские, которые весьма рискованные, должно по максимуму инвестировать государство. А когда начинается коммерциализация изделия, государству следует устраниваться. В России государство не хочет этого делать, ему это накладно. У нас не урегулированы многие правовые вопросы. В ФЦП предусмотрено, что права на разработку принадлежат государству и автору, но когда принадлежат двум — значит, не принадлежат никому.

Я неоднократно консультировался с юристами, могу ли я как разработчик отдать третьей стороне права на изобретение, или я должен спросить у государства? Если я должен спросить у государства, то у кого конкретно? Ответов нет.

Государство должно запустить проект, чтобы появились рабочие места, производились установки. А у нас получается, государство выступает в качестве бизнесмена — оно что-то разработало и теперь хочет это продать. Не должно оно продавать.

Кроме того, что возникает масса юридических казусов, на коммерциализацию нужны большие деньги. Если вы на НИОКР получили деньги, и они привели к какому-то успеху, то на коммерциализацию надо затратить еще на порядок больше денег, чтобы наладить производство, открыть рынки, обеспечить сервисное обслуживание, рекламу и прочее.

Чтобы привлечь такие деньги, потенциальным инвесторам нужно объяснить, что у тебя за разработка, откуда, кто собственник. Но когда я показываю те формулировки, которые

имеются в госконтрактах, все остаются в недоумении. Бизнесмены боятся участвовать в коммерциализации при таких неопределенных условиях.

**Даниленко Валерий Николаевич, заведующий отделом генетических основ биотехнологии Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, доктор биологических наук, профессор, секретарь Совета при Президиуме РАН по координации научных исследований по направлению «Медицинская техника, технологии и фармацевтика»**

**Как Вы оцениваете эффективность ФЦП «Исследования и разработки» Роснауки РФ как инструмента поддержки и развития науки?**

– Эта программа, и особенно выделение приоритетного направления ФЦП «Живые системы», оказалась очень своевременным шагом. За последние годы ФЦП внесла существенный вклад в развитие науки России. Без такой программы не произошли бы те положительные сдвиги, которые отмечаются в секторе академической и вузовской науки по данному направлению.

Вместе с тем эта программа не решает многие существующие проблемы. Одна из них заключается в том, что поддерживаемые в рамках ФЦП проекты, в том числе так называемые комплексные, в итоге как бы повисают в воздухе. Разработанные технологии и продукты не выходят на рынок, не внедряются в производство, т.е. отсутствует преемственность, единая цепочка от фундаментальных исследований до конечного инновационного лекарства, технологии. Это связано с ведомственной разобщенностью: до сих пор не удается наладить взаимодействие профильных программ Роснауки, Минздравоохранения, Минпромторга. Кроме того, никак не координируются исследования, которые выполняются по ФЦП с теми, что ведутся при поддержке программ президиума РАН, РФФИ и других фондов.

Наконец, при формировании тематики проектов, особенно на первом этапе реализации программы, не всегда правильно выбирались приоритеты в силу отсутствия достаточного количества экспертов по отдельным направлениям, например по созданию инновационных лекарств. Нельзя не отметить проблему слабости нашего экспертного сообщества. Еще один принципиально важный момент. При оценке конкретных проектов чиновники не должны играть определяющей роли. Государство в их лице должно организовать правильную, эффективную работу подобранных экспертов, наладить механизм взаимодействия с разработчиками проектов, бизнесом.

В рамках ФЦП «Исследования и разработки» в области «Живых систем» в конце концов были выработаны и стали достаточной профессионально реализовываться механизмы экспертного отбора и продвижения проектов, мониторинга их качества. На мой взгляд, опыт инфраструктурного обеспечения, работы координационного совета и рабочих групп этой программы нужно сейчас активно использовать при формировании и продвижении других ФЦП, в частности программы Минпромторга РФ «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности РФ на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

**Если говорить стратегически — в целом о системе поддержки науки, в каких вопросах государство должно выполнять активную роль, а в каких — устраниваться?**

– Совершенно очевидно, что в российской науке на сегодняшний день без конкретной политики и поддержки государства ничего не изменится. Консервативность существующей системы, негативный груз девяностых годов не способствуют быстрому обновлению. Вмешательство государства необходимо в расстановке приоритетов, в создании эффективных

механизмов их реализации, в целевой финансовой поддержке. Работа в этом направлении началась: так, летом прошлого года была создана Комиссия при президенте по модернизации и технологическому развитию экономики России. Но необходимо и в дальнейшем работать над проблемой интеграции министерств, ведомств, бизнеса, уделять внимание эффективному использованию инновационных возможностей РАН и РАНХ, контролировать отбор и продвижение крупных инновационных проектов. В своем выступлении перед студентами и на заседании Комиссии по модернизации в г. Томске президент Д. Медведев еще раз подчеркнул важность инноваций, активного участия бизнеса в этом процессе, создания адекватных возможностей для работы российских ученых. Абсолютно правильно президент сказал, что зарплаты ученых необходимое, но не самое важное в успешном решении проблем науки в России.

В основном те подходы и принципы, которые заявляются при формировании научно-технических программ, правильные. Другое дело – как они реализуются на практике. Наука – важнейшая часть экономической системы, ученые – часть российского общества, и все проблемы, которые есть в стране, есть в большей или меньшей степени и в науке. Например, при формировании той же ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности РФ на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» за это дело снова взялись чиновники, а научное экспертное сообщество, которое должно играть более активную роль в разработке программы, практически не привлекается. А привлекать нужно активнее не только экспертов, ученых, но и производителей, технологических специалистов, понимающих и знающих, что в этом направлении делать. У нас, как и во всем мире, в последние годы было практически к минимуму сведено участие ученых, технологов, профильных специалистов в разработке и принятии решений, связанных с инновациями, технологическим перевооружением конкретных областей, в нашем случае фармпромышленности. Все было отдано на откуп так называемым менеджерам нового поколения, зачастую не очень профессиональным, не очень подготовленным к решению конкретных проектов и задач. И этот подход, как сейчас оценивает международное сообщество, оказался неверным.

**Дежина Ирина Геннадьевна, завсектором экономики науки и инновационных процессов Института мировой экономики и международных отношений РАН (ИМЭМО РАН), доктор экономических наук**

Государственная поддержка внедрения научно-технических инноваций на предприятиях – одна из главных задач федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России». Насколько механизмы этой господдержки понятны, прозрачны и эффективны? Свою точку зрения высказала эксперт ИМЭМО РАН Ирина Дежина.

**Приоритетные направления развития науки и технологий выбирались без широкого привлечения бизнес-сообщества. Насколько это правильно?**

– Эти приоритетные направления так широко сформулированы, в таких общих терминах, что при желании к ним можно адаптировать практически любые потребности. В США, например, приоритетных направлений вообще нет, есть критические технологии, разработка которых необходима государству. Но к формированию их перечня привлекается

и бизнес-сообщество, так как государство заказывает их разработку в том числе частным компаниям.

На мой взгляд, на бюджетные деньги в любом случае нельзя финансировать проекты, интересные исключительно бизнесу. Замещение частных средств государственными в конце концов приводит к снижению инвестиционной активности предпринимателей. Бизнес, безусловно, должен участвовать в выборе тех проектов, которые он готов софинансировать, однако в зависимости от вида и стадии разработки размер его финансового вклада необходимо изменять.

**Какова зарубежная практика осуществления подобных программ, чем она отличается от нашей?**

– Можно привести в пример американскую Программу передовых технологий (АТР – Advanced Technology Program), реализация которой закончилась в 2007 году. На средства программы поддерживались разработки, которые осуществлялись компаниями или консорциумами из фирм, университетов и/или государственных лабораторий.

Проекты отбирались по двум базовым критериям: во-первых, возможности появления в результате их реализации технологий, которые будут обладать потенциалом для широких межотраслевых приложений, либо открывать новые рынки; во-вторых, принадлежности проектов к ранней стадии разработки.

Финансирование было совместным: консорциумы, объединяющие две или более компании, должны были оплачивать не менее половины стоимости проекта, а крупные компании – не менее 60 %. Остальную долю выплачивало государство, но только федеральным лабораториям, прав перечислять бюджетные деньги частным структурам просто не было.

От ФЦП, как мы видим, два ключевых отличия: во-первых, не предусматривалось перечисление бюджетных средств частным структурам, а во-вторых, финансирование проектов со стороны государства и бизнеса было как минимум паритетным. А в нашей ФЦП минимальная доля внебюджетных инвестиций в крупных проектах всего 30 %.

Ход выполнения работ по АТР регулярно отслеживался, публиковалась статистика. Оценка программы в целом показала, что ее реализация оказала позитивное влияние на поведение американских фирм: 61 % увеличили финансирование НИОКР, 67 % увеличили объемы инвестиций в долгосрочные наукоемкие проекты, 71 % проявили больший, чем раньше, интерес к сотрудничеству с государственным сектором науки. А у нас? ФЦП реализуется много лет, несколько раз ее модифицировали. Но есть ли где-то данные, которые бы показали, что в ее рамках был опробован тот или иной механизм сотрудничества государства и бизнеса, и один дал результат лучше, а второй – хуже или не сработал? Таких данных нет, и потому складывается впечатление, что это достаточно формальный механизм распределения бюджетных денег здесь и сейчас, который серьезно не оценивался.

Пока в России разработка технологий в плачевном состоянии. Инженерная наука все еще в кризисе, число инженеров, работающих в науке, сокращается. У нас стабильная доля фундаментальных исследований (14–15 % общих затрат на науку), большой удельный вес разработок (почти 70 %) и очень скромная доля прикладных исследований (15–16 %, при том что в СССР, перед его распадом, было 33 %). То есть в условиях разрушенной прикладной науки делаются небольшие усовершенствования, не основанные на серьезных, прорывных научных результатах. Отсюда и соответствующий уровень технологий.

подчеркивает заместитель руководителя Роснауки **Александр Клименко**. Поэтому на всех стадиях инновационной цепочки в программе поставлена задача привлечения внебюджетных средств от тех организаций, которые впоследствии должны будут внедрять в производство полученные результаты. «То есть этой программой государство как бы протягивает руку бизнесу, предлагая объединить усилия в поиске, определении и разработке новых инновационных технологий», – резюмирует Клименко.

Современная структура управления и идеология ФЦП сложились в 2004 году, когда вышло постановление правительства РФ, содержательно изменившее предшественницу нынешней ФЦП – программу «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» на 2002–2006 годы. ФЦП в начале своего становления зачастую не достигала ожидаемых комплексных эффектов, не обеспечивала скоординированной реализации программных мероприятий, представляя собой совокупность разрозненных проектов. Проблемы недостаточной эффективности ФЦП оказались в центре внимания государства и решались путем совершенствования механизмов реализации программы, а также изменением концепции менеджмента – от «распоряжения бюджетными ресурсами» к «управлению результатами». В связи с новой парадигмой госуправления ФЦП пополнилась совокупностью качественно и количественно измеримых индикаторов, предназначенных для мониторинга и контроля достижения намеченных целей и результатов.

Одна из основных задач ФЦП – запуск и отладка механизма конкурсного финансирования научных исследований. Это означает, прежде всего, создание экспертного сообщества в стране, отработку конкурсных процедур, механизмов экспертизы и финансирования. По новой системе управления программой были разделены сферы ответственности: за научную составляющую отвечает научное сообщество, а за соблюдение формальных требований и законов – чиновники и соответствующий аппарат, который сопровождает программу.

В рамках федеральной программы научные коллективы сами формируют тематику будущих конкурсов и лотов. Предложенные учеными темы НИ-ОКР проходят вполне прозрачную и демократичную процедуру отбора и согласований на рабочих группах с участием авторитетных ученых. После этого объявляются конкурсы, подаются заявки (всеми желающими вне зависимости от формы собственности и ведомственной принадлежности), которые оцениваются корпусом профильных специалистов.

«Когда ФЦП запускалась, то после 15–20 лет безденежного содержания российской науки было совершенно непонятно, каково состояние научно-технических коллективов, на что они способны и какие направления еще живы, – рассказывает директор ГУ «Государственная дирекция целевой научно-технической программы» **Андрей Петров**. – Реализация программы состояла фактически в следующем: провести активный мониторинг состояния научных коллективов, выяснить потребности бизнеса, реального сектора по разработкам, а с другой стороны – выяснить возможности коллективов. На это ушли первые два года программы».

В результате этой работы впервые, по словам Сергея Мазуренко, удалось получить «достаточно сфокусированный научно-технологический пейзаж России». То есть понять, на каком уровне развития находятся в стране те или иные исследования и разработки и кто на что способен при их создании и внедрении. В этом плане самые наглядные примеры, по мнению главы Роснауки, связаны с проектами в области нано- и биотехнологий.

#### **ПРИОРИТЕТ – ЖИВЫМ СИСТЕМАМ**

Эффективная диагностика заболеваний, создание сельскохозяйственных культур с повышенным содержанием витаминов, новые вакцины и лекарства – эти и многие другие технологии относятся к области «живых систем». В настоящее время наблюдается чрезвычайно быстрое, стремительное развитие данного направления. Это, пожалуй, самая динамичная область современного естествознания. Имеются огромные перспективы применения наук о жизни в современной биологии, медицине, сельском хозяйстве, созда-

нии природных материалов и т.д. Все эти возможности, которые могут обогатить промышленность наукоемкими технологиями, улучшить здоровье и повысить качество жизни человека, объясняют тот факт, что «живые системы» являются одним из главных государственных приоритетов в области науки и техники, который активно поддерживается с помощью федеральных целевых программ, в том числе ФЦП «Исследования и разработки».

По объему государственных вложений приоритетное направление ФЦП «Живые системы» занимает одно из лидирующих мест – на исследования в этой области выделяется более 30 % от общего финансирования программы. В 2009 году на эти цели потрачено 2,8 млрд рублей. И хотя по бюджетным вложениям данное направление уступает «Индустрии наносистем и материалов» (41,4 % от общего объема ФЦП – 3,8 млрд), однако по значимости исследований эти работы занимают ключевое место.

«Живые системы» притягивают сегодня повышенное внимание ученых всего мира. Работы в этой области находятся на переднем крае науки и объединяют биологов, химиков, физиков, математиков. Многие эксперты полагают, что именно живые системы станут основой для новой технологической революции, базой для формирования нового технологического уклада. Все эти факторы объясняют большое количество участников в ФЦП по направлению «Живые системы». В 2007 году поступило 717 заявок (13,6 % от общего количества предложений), подписано 284 контракта, их бюджет превысил 2,6 млрд рублей. В 2008 году было подано 939 заявок на формирование тематики по «Живым системам». Количество заключенных контрактов составило 179 (всего вместе с продолжающимися контрактами – 731). В 2009 году велись работы по 282 проектам, при этом 225 из них – это контракты на проведение фундаментальных исследований в области наук о живом и разработки технологий. Проекты выполняли организации самых различных форм собственности и ведомственной принадлежности из семи регионов России.

«Мы поддерживаем наиболее интересные и перспективные разработ-



ки, – отмечает заместитель руководителя Федерального агентства по науке и инновациям РФ **Инна Биленкина**. – В стране есть хороший научный задел, сильные коллективы ученых, которые могли бы создавать и эффективные лекарства, и необходимую медицинскую технику. Проблема в том, что эти разработки пока не очень востребованы бизнесом. Преодоление разрыва между фундаментальной наукой и промышленностью я считаю первоочередной задачей».

За время реализации программы в ее адрес звучало немало критики. В частности, нередко в упрек ставилась оторванность выполняемых исследований от потребностей промышленности. В Роснауке признают актуальность этой проблемы. И принимают попытки для ее решения.

«То, что сами ученые предлагают, не всегда стимулирует выход на новые

рубежи, – считает начальник Управления программ и проектов Роснауки **Геннадий Шепелев**. – Для финансирования проще предложить то, что ученый хорошо понимает, что он заведомо выполнит и без особого напряжения получит за это деньги. На мой взгляд, нужно переходить при формировании конкурсов от той тематики, которую предлагают ученые, к постановке каких-то серьезных бизнес-задач, поддержанных промышленностью».

В идеале должны существовать два параллельных варианта управления программой. Первый – формирование тематики научным сообществом. Второй – когда государство свои задачи и потребности формулирует в виде конкретного задания, считает Инна Биленкина.

Начиная с 2009 года часть средств ФЦП стали тратить на целевой заказ. В прошлом году таким образом была

распределена четверть средств программы, которые направили на выполнение 50 проектов. В 2010–2011-м по новой схеме планировалось потратить половину средств, а в 2012–2013-м – три четвертых средств должны пойти на крупные цели, которые объединят несколько десятков проектов.

Однако в связи с тем, что 70 % ресурсов программы на 2010 год урезаны, то выполнить намеченные планы будет невозможно. Иначе под угрозой закрытия окажутся те трехлетние проекты, которые были начаты еще в 2008 году и продолжатся в 2010-м включительно. Тем не менее, как заверил Андрей Петров, в Роснауке будут и дальше стараться запустить централизованные большие задачи – условно говоря, по формированию госзаказа на достижение больших целей. ●

## Справочное приложение

*ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2012 годы»*

*ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2012 годы» стала логическим продолжением программы с аналогичным названием на 2002–2006 годы.*

Министерство науки и образования РФ как заказчик – координатор ФЦП устанавливает «правила игры»: определяет положение о программе и управляющих органах, процедуры экспертиз и приемки работ. Главным госзаказчиком в этом процессе выступает Роснаука, которая является распорядителем бюджетных средств от лица государства, а также организует сбор заявок по формированию тематики ФЦП и проводит их предварительную экспертизу.

Управляет программой Научно-координационный совет (НКС), которым руководит министр образования. Этот совет определяет объем и сроки финансирования проектов. А кроме того, формирует экспертные группы по приоритетным направлениям. В них входят наиболее квалифицированные эксперты в своих областях, а также представители разных ведомств, ученые, бизнесмены, технологи. База экспертов насчитывает более двух тысяч человек. Задача экспертных групп – помочь НКС сформировать тематику, которая определяется на базе заявок, поступающих от научного сообщества. Предложенные проекты оцениваются с точки зрения актуальности, новизны и научной значимости возможных результатов исследований. Члены группы анализируют ожидаемые результаты, сопоставляют пред-

лагаемую цену и объем работ, после этого делают вывод о целесообразности инициирования проекта. По этой тематике Роснаука проводит конкурсы и заключает госконтракты.

Структурообразующие элементы ФЦП – блоки мероприятий:

- «Генерация знаний».
- «Разработка технологий».
- «Коммерциализация технологий».
- «Институциональная база исследований и разработок».
- «Инфраструктура инновационной системы».

Исследования и разработки в области живых систем, а также работы по коммерциализации их результатов осуществляются в рамках значительного числа проектов, относящихся к разным блокам и мероприятиям ФЦП, а именно:

**1. Блок 1, мероприятие 1.2** «Проведение проблемно-ориентированных поисковых исследований и создание научно-технического задела по технологиям в области живых систем»: выполнение проектов в течение 1–2 лет и объемом финансирования одного проекта в размере до 10 млн рублей в год. Результаты выполненных работ должны иметь определенный обоснованный рыночный потенциал.

**2. Блок 2, мероприятие 2.2** «Осуществление комплексных проектов, в том числе разработка конкурентоспособных технологий, предназначенных для последующей коммерциализации в области живых систем»: выполнение проектов, включающих ОКР и ОТР, со сроком реализа-

ции 2–3 года и объемом финансирования одного проекта в размере до 100 млн рублей в год и долей внебюджетных средств не менее 25 %.

Результат комплексного проекта должен обладать значительным потенциалом коммерческого использования, а исполнитель по условиям госконтракта зачастую обязуется вовлечь этот результат в хозяйственный оборот.

**3. Блок 2, мероприятие 2.7** «Проведение опытно-конструкторских и опытно-технологических работ совместно с иностранными научными организациями или по тематике, предлагаемой бизнес-сообществом»: объем финансирования одного проекта — до 50 млн рублей в год и долей внебюджетных средств не менее 50 %. Результат проекта должен удовлетворять потребности отдельного бизнеса, инициировавшего эту работу, либо быть получен при непосредственном участии иностранной научно-исследовательской организации, но коммерциализован строго на территории России.

**4. Блок 3, мероприятие 3.2** «Осуществление проектов коммерциализации технологий по тематике, предлагаемой бизнес-сообществом»: выполнение инновационных проектов, включающих НИОКР, производство и сбыт высокотехнологичной продукции.

Данная категория проектов по своей сути близка предыдущей, но отличается от нее масштабами и четкой ориентацией на коммерциализацию разработок. Инициировать проекты данного вида могут высокотехнологичные промышленные организации любых организационно-правовых форм и форм собственности, а также инновационные промышленные компании в связке с научно-исследовательскими и образовательными организациями. В рамках этих проектов государство финансирует часть НИОКР при условии, что остальные расходы (подготовка производства, расходы на рекламу, маркетинг и др.) несет бизнес.

Срок реализации проектов составляет не более 3 лет, годовой объем финансирования одного проекта за счет средств федерального бюджета не превышает 100 млн рублей, уровень внебюджетного софинансирования составляет не менее 70 %;

**5. Блок 3, мероприятие 3.1** «Реализация важнейших инновационных проектов государственного значения (да-

лее – VIP) по приоритетным направлениям Программы»: выполнение крупных инновационных проектов, обеспечивающих:

- необходимый уровень национальной безопасности,
- получение экономического эффекта, имеющего значение как для экономики в целом, так и для ее крупных секторов,
- решение наиболее актуальных задач в социальной сфере, в первую очередь задач, связанных с повышением качества жизни населения.

В рамках каждого проекта предусматривается реализация цикла работ от создания перспективного инновационного продукта, имеющего значительный потенциал коммерциализации, до освоения промышленного производства новой и усовершенствованной высокотехнологичной продукции и начала ее успешной реализации на рынке;

Приоритетные проекты формируются на условиях партнерства государства с бизнес-сообществом и предусматривают распределение между ними рисков по их реализации. Объем финансирования одного такого проекта за счет средств федерального бюджета составляет 1 – 2 млрд рублей, объем внебюджетного софинансирования должен составлять не менее 60 % общего объема финансирования проекта. Продолжительность реализации проекта составляет не более 4 лет.

В условия государственного контракта исполнителю вменено в обязанность обеспечить 5-кратное превышение объемов продаж разработанной высокотехнологичной продукции относительно затраченных на проект бюджетных средств.

Заявляемые проекты должны «укладываться» в рамки критических технологий РФ по направлению «Живые системы»:

- Клеточные технологии,
- Технологии биоинженерии,
- Геномные и постгеномные технологии создания лекарственных средств,
- Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные технологии,
- Биомедицинские и ветеринарные технологии жизнеобеспечения и защиты человека и животных.●

Финансирование программы по направлениям реализации

	Объем бюджетного финансирования в 2007 г., млн руб.	Доля бюджетного финансирования, %	Объем бюджетного финансирования в 2008 г., млн руб.	Доля бюджетного финансирования, %	Объем бюджетного финансирования в 2009 г., млн руб.	Доля бюджетного финансирования, %
Живые системы	2 657.88	25.10 %	3 242.63	24.50 %	2 836.95	30.32 %
Индустрия наносистем и материалов	4 245.35	40.09 %	5 458.61	41.24 %	3 877.51	41.44 %
Информационно-телекоммуникационные системы	840.959	7.94 %	1161.17	8.77 %	734.18	7.85 %
Рациональное природопользование	944.99	8.92 %	1220.29	9.22 %	573.74	6.13 %
Энергетика и энергосбережение	1 900.00	17.94 %	2 154.89	16.28 %	1 333.88	14.26 %

Расходы федерального бюджета по Роснауке за 2004–2009 годы

# РФФИ: тревожное будущее главного грантового фонда

И.А. Стерлигов, STRF.ru, специально для Acta Naturae

Российский фонд фундаментальных исследований – старейший и наиболее признанный отечественный научный грантодатель, созданный в 1992 г. указом Бориса Ельцина «О неотложных мерах по сохранению научно-технического потенциала Российской Федерации». Среди прочих направлений фонд активно поддерживает исследования по наукам о жизни, выделяя на них около 20 % всех своих средств

## ЦЕЛИ, МАСШТАБЫ И МЕХАНИЗМЫ

В наше время повсеместного внедрения инноваций РФФИ, подчиненный непосредственно Правительству, остается организацией, поддерживающей прежде всего фундаментальные исследования, и тому есть очевидные основания.

«Не стоит делить науку на полезную и бесполезную, – уверен начальник управления проектов по биологии и медицине фонда **Валерий Смирнов**, – вспомним, все основы современной генетики и молекулярной биологии были заложены при исследовании морщинистости плодов гороха Менделем или при изучении цвета глаз плодовой мушки-дрозофилы». Поэтому в РФФИ ждут от заявителей проекты, нацеленные не столько на внедрение в практику (хотя «ориентированное» направление тоже есть, о нем ниже), сколько на постижение и прояснение законов и форм существования природы.

Для тех, кто способен решать такие задачи, фонд предлагает ряд конкурсов, основным из которых является конкурс инициативных проектов. Поддерживаются заявки на проведение исследований, поданные отдельными учеными или коллективами до 10 человек, вне зависимости от званий, степеней, возраста и т.д. Единственное требование: заявитель должен работать в российской организации, в уставе которой прописано, что она занимается наукой.

Размеры поддержки сравнительно невелики, в 2009 г. по биологии и медицине средний грант составил 380 тыс. руб. Максимально возможный объем гранта достигает 750 тыс. руб. «*Определяя сумму, которую мы выдаем исследователю, мы смотрим, насколько затратна его работа*», – поясняет Смирнов.

В фонде признают, что размеры грантов не соответствуют международной практике – средний грант должен быть в районе 1 млн руб., но финансирования пока недостаточно. В 2010 г. общие ассигнования на инициативные проекты по биологии и медицине составят всего 612 млн руб.

Эта сумма будет равномерно распределена по трем секциям: общая биология, физико-химическая биология, фундаментальная медицина и физиология. В соответствии с указаниями высшего руководства фонда будет удовлетворено ровно 30 % поступивших заявок. Итоги экспертизы подведут в марте.

Сама экспертиза устроена следующим образом: управление биологии и медицины формирует экспертный совет из 64 человек, по 21–22 человека в каждой из трех секций. В совет включаются ведущие отечественные специалисты, как правило – доктора наук. Экспертами не могут быть директора и заместители директоров научных организаций, сотрудники аппарата госакадемий и т.д. Секции включают по 8–10 дисциплин, по каж-

дой из которых в совете специализируются 1–2 человека.

Экспертный совет утверждается советом фонда, который, в свою очередь, формируется правительством. Члены экспертного совета работают максимум два срока по три года. Они – уже без участия сотрудников РФФИ – набирают пул внешних экспертов, в случае биологии и медицины это около 300 человек. Сейчас в фонде готовы начать привлекать к оценке проектов членов российской научной диаспоры.

Ключевая роль в проведении экспертизы принадлежит руководителю секции. Именно он распределяет заявки по экспертам. Каждую анализируют 2–3 человека, выставляющие ей оценки по 9-балльной системе. После того как все рецензии получены, заявки разбираются на заседании экспертного совета, который своим решением иногда может предпочесть заявку с меньшим числом баллов другим, оцененным выше. «*При оценке нам здорово помогают публикации в рецензируемых журналах с высоким импакт-фактором, к сожалению, в основном зарубежных*», – добавляет Смирнов. Однако формальных библиометрических требований не выдвигается. Сроки экспертизы значительные – по заявкам, поступающим до 15 сентября, итоги подводятся в начале марта.

Рецензии заявителям не рассылаются. В самом РФФИ это расценивают как серьезный недостаток, в оправдание ссылаясь на занятость сотрудников и проблемы с содержанием отзывов. Так, эксперт может написать, что работа интересная, коллектив профессиональный и т.д., но поставить всего 5 баллов. Впрочем, в планах фонда система рассылки рецензий все-таки значится, но конкретные сроки ее внедрения нам сообщить не смогли.

Несколько особняком в деятельности РФФИ стоит программа поддерж-



ки ориентированных исследований, т.е. основы для прикладных разработок.

По соглашениям с различными госакадемиями и ведомствами проводится конкурс ориентированных целевых исследований (код «офи-ц»), предполагающий дальнейшее развитие сильными коллективами полученных ранее перспективных результатов.

В 2009 г. были впервые проведены конкурсы междисциплинарных ориентированных проектов («офи-м»). Как рассказал начальник управления ориентированных исследований РФФИ Сергей Цыганов, биологические и медицинские заявки были поддержаны по 3 из 18 выбранных фондом направлений: «*Фундаментальные основы создания новых лекарственных препаратов и вакцин*», «*Фундаментальные аспекты геномики и протеомики эукариот*» и «*Когнитивные исследования*». Больше всего проектов – 28 – посвящено созданию новых лекарств. Средний размер ориентированного гранта – порядка 1.6 млн руб. в год.

Все заявки на участие в «офи-м» и «офи-ц» оценивает специальный

экспертный совет. К участию допускаются только коллективы, ранее получившие гранты РФФИ или других уважаемых фондов и/или имеющие публикации в высокорейтинговых журналах. В остальном условия участия такие же, как в основном конкурсе инициативных проектов.

Кроме того, фондом реализуется небольшая программа поддержки целевых исследований, проводящихся в интересах РАМН.

### БУДУЩЕЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Почти все активно работающие российские ученые согласны, что именно РФФИ является самым эффективным механизмом конкурсной поддержки широкого спектра фундаментальных исследований. Отмечаются высокое качество экспертизы, понятные правила участия, отсутствие чрезмерного бюрократизма. Ключевой проблемой является размер грантов, не соответствующий реалиям современной экспериментальной науки.

В этих условиях правительство, вначале одобрившее удвоение бюджета фонда к 2010 г., затем отказалось от своих планов, не только остановив развитие РФФИ, но и отбросив его

назад. Если в 2009 г. бюджет фонда составил 7.1 млрд руб., то на 2010 г. выделено всего 6 вместо планировавшихся до кризиса 12 млрд.

Говорить о развитии при таком жестком внешнем секвестре бессмысленно. Сейчас в фонде могут лишь с сожалением говорить о недавних планах довести средний размер инициативного гранта до 1 млн руб., о предложении экспертного совета по биологии о введении стартовых грантов для молодых исследователей, о софинансировании поступающих из-за рубежа предложений о совместных ориентированных проектах и т.д.

Остающиеся надежды сотрудников РФФИ связаны с инновационными планами президентской комиссии по модернизации – на одном из ее заседаний была представлена концепция «инновационного лифта», начинающегося как раз с поддерживаемых фондом исследований. Сам РФФИ был назван «институтом развития». Возможно, за словами последуют решения, позволяющие это развитие возобновить. На то, что в правительстве вдруг осознают важность фундаментальной науки как таковой, надежд гораздо меньше. ●

## Тем не менее, несмотря на внешние ограничения развитию российской грантовой системы, мы попросили ведущих отечественных биологов поделиться сообщениями о работе РФФИ, ответив на три вопроса:

1. Что можно сделать на грант РФФИ, какие функции он выполняет?
2. Что нравится и не нравится в работе фонда помимо размеров грантов?
3. Как нужно в будущем развивать поддержку биологических проектов в рамках РФФИ?

Елизавета Бонч-Осмоловская, д.б.н., зав. лабораторией гипертермофильных микробных сообществ Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН

### «ГРАНТЫ РФФИ ОЧЕНЬ ХОРОШИ ДЛЯ СТАРТА ГРУППЫ ИЛИ ЛАБОРАТОРИИ»

1. Гранты РФФИ, действительно, велики. Но они вполне могут поддер-

жать работу небольшой группы. И они очень хороши для начала, когда группа или лаборатория еще только начинает раскручиваться. Так было и в случае нашей лаборатории – мы в течение нескольких лет получали только РФФИ, а потом пошли и большие проекты. Сейчас лаборатория так разрослась, что одним РФФИ, конечно, не обойдешься, но мы продолжаем их писать и получать, выполняя небольшие поисковые работы – заделы на будущие масштабные проекты.

2. Нравится честность (относительная, по сравнению с большинством других конкурсов и программ) – ясно, что есть люди, которым обязательно дадут грант даже и за плохой проект, но все-таки в РФФИ они не перекры-

вают дорогу тем, кто действительно хорошо работает на современном уровне. Не нравится отсутствие обратной связи – люди должны знать, почему их проект не прошел, т.е. видеть рецензии.

3. Я считаю, что надо отменить региональные конкурсы (внутрироссийские), так как там уровень работ гораздо ниже, чем в основном конкурсе инициативных проектов. Может быть, на время стоит отменить и многие другие виды конкурсов РФФИ (издательские, на организацию и участие в конференциях, экспедиции), чтобы максимально увеличить гранты по инициативным проектам. Ведь если реальной научной работы не будет, то и все остальное не понадобится. Я бы отме-

## РФФИ: мнения экспертов-научковедов

**Татьяна Кузнецова, к.э.н., директор Центра научно-технической, инновационной и информационной политики Института статистики и экономики знаний ГУ-ВШЭ**

### «НЕБОЛЬШИЕ ГРАНТЫ ОБЕСПЕЧИВАЮТ ПОДДЕРЖКУ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ, А НЕ ИССЛЕДОВАНИЙ»

В развитых странах сложилась эффективная система научных фондов, имеющих, как правило, специальный правовой статус. Как общепризнанный институт развития они сегодня претерпевают сложные и разноплановые изменения, расширение функций и направлений деятельности (переориентация на многопрофильность, диверсификация тематических областей, поддержка инновационных проектов, содействие трансферу научных результатов, инвестирование в малые наукоемкие компании, поддержка кооперации, расширение информационных и экспертных функций).

Иная картина в России. В самом общем виде проблемы, с которыми сталкиваются научные фонды, можно свести к четырем группам, связанным с масштабами, разнообразием, временными ограничениями, порядком создания и деятельности.

1) Из-за низких масштабов финансирования средний размер гранта фондов невелик. Это снижает их привлекательность, препятствует повышению эффективности – небольшие гранты фактически обеспечивают поддержку исследователей, а не исследований.

2) Сохраняется неопределенность условий, механизмов, порядка получения и предоставления денежных средств для безвозмездной поддержки проектов, включая ее грантовую форму. Фонды как участники бюджетного процесса подчиняются бюджетному законодательству. До сих пор не преодолено противоречие между их статусом как главных распорядителей бюджетных средств и вневедомственным характером предоставления ими грантов (в форме субсидий). Законодательство не учитывает в полной мере специфику их деятельности – конкурсное финансирование инициативных проектов, отбираемых по результатам квалифицированной экспертной оценки. Остаются вопросы по правилам отбора проектов, форме договоров по финансированию победителей конкурсов и т.д.

3) Не решен вопрос с организационно-правовой формой фондов. Рассматриваемый в настоящее время проект по изменению правового статуса учреждений на первый взгляд ситуацию может даже ухудшить.

4) РФФИ и РГНФ жестко ориентированы на фундаментальную науку и сталкиваются с ограничениями при поддержке других проектов, обвинениями в нецелевом использовании бюджетных средств.

По-прежнему отсутствует специальное нормативное регулирование деятельности фондов, что создает множество проблем (правовой статус, правовой режим денежных средств, поступающих в их распоряжение, условий и порядка их предоставления). Речь идет и о правовом статусе гранта (условия договора о его предоставлении; право предоставлять гранты как юридическим, так и физическим лицам). Важно в принципе расширить права фондов использовать разнообразные финансовые схемы (заключение госконтрактов, договоров на предоставление грантов, договоров займа и др.). Целесообразно наделить их реальным правом получать средства не только из федерального бюджета, но и из других источников.

Проблема российских научных фондов заключается не только в том, что их нормативная база медленно встраивается в действующее законодательство. Она решается и, в конце концов, будет решена. Главное – осознание и оформление самой идеологии поддержки науки и инноваций через систему разнообразных фондов, миссии этих фондов.

Пока что у нас возможности и полномочия научных фондов, их роль в поддержке науки и инноваций регулярно и последовательно сокращают, что, очевидно, противоречит мировым тенденциям.

**Ирина Дежина, д.э.н., завсектором ИМЭМО РАН**

### «ФОНДЫ ФИНАНСИРУЮТ НЕ ТОЛЬКО НАУКУ, НО И ОБЕСПЕЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ПРОЦЕССА»

Государственные научные фонды – РФФИ и РГНФ – «по умолчанию» считаются самым прозрачным и справедливым механизмом распределения бюджетного финансирования на научные исследования, причем не только на фундаментальную науку, но и на обеспечение исследовательского процесса: РФФИ эффективно финансировал и администрировал программу поддержки ведущих научных школ, развивал систему закупки, а главное – использования научного оборудования в интересах всех грантополучателей, в том числе фактически поощряя создание системы некоммерческих центров коллективного пользования.

РФФИ и РГНФ очень популярны среди ученых еще и потому, что это практически единственные структуры, где можно получить деньги для поездок на конференции, в том числе за рубеж. В научных организациях и вузах, как правило, нет средств для оплаты научных поездок своих сотрудников, не занимающих высокие административные посты.

Тем не менее в отношении научных фондов продолжает проводиться не самая благоприятная государственная политика. Во-первых, они регулярно недофинансируются: по закону РФФИ и РГНФ должны получать суммарно 7 % бюджетных ассигнований на гражданскую науку. Согласно данным Росстата, доля грантового финансирования составила 6.1 % в 2007 г. (вместе с Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, которому по закону должно выделяться 1.5 %), в 2008 г. – 6.7 %, в 2009 г. (предварительные данные) – 5.6 %.

Во-вторых, у научных фондов крайне неустойчивое правовое положение. В 2009 г. решался вопрос статуса научных фондов – в идеале он должен быть таким, чтобы фонды могли распределять средства любым грантополучателям, выигравшим конкурс. Пока они именно так и работают, но разрешено это было согласно отсрочке, которая была закреплена в Бюджетном кодексе и действовала до 1 января 2010 г. В декабре 2009 г. существующий порядок финансового обеспечения грантов был продлен – иными словами, принятие решения о фондах просто отсрочили еще на один год.

Оптимальным вариантом было бы внесение изменений в Бюджетный кодекс, которые закрепили бы за фондами специальный статус, позволив им быть главными распорядителями бюджетных средств и выделять эти средства посредством грантов.

Безусловно, бюджетное обеспечение фондов должно быть также увеличено; при этом им следовало бы передать (вернуть) администрирование ряда программ. При отсутствии других эффективных механизмов фонды могут также стать основным организационным центром для проведения экспертизы научных проектов, в том числе с привлечением зарубежных ученых.

нила и ориентированные фундаментальные исследования – для этого есть Миннауки (имеется в виду ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям»). В 2010 г. эта программа приостановлена – И.С.).

**Владимир Гвоздев, академик РАН, зав. отделом молекулярной генетики клетки Института молекулярной генетики РАН**

**«ИССЛЕДОВАТЕЛЬ С ПУБЛИКАЦИЯМИ В ПРИЛИЧНЫХ ЖУРНАЛАХ ПОЧТИ ВСЕГДА ПОЛУЧИТ ГРАНТ»**

1. Можно купить кое-какие реактивы. Чуть-чуть добавить к более чем скромной зарплате. О покупке оборудования не может быть и речи, учитывая размер гранта.

2. Исследователь, имеющий публикации в приличных журналах, практически всегда получит грант. Форма представления гранта приемлема и не столь устрашающая, как в лотах Минобрнауки-Роснауки. Правда, ее можно было бы еще упростить, опустив адреса и телефоны участников гранта.

Жаль, из РФФИ ушла поддержка научных школ. Теперь подготовка заявки на школу стала мучительным занятием, а чиновники, которым совсем нечего делать, изображают активность, придумывая новые и новые формы и требуя длиннейших отчетов.

Считаю, что в РФФИ экспертная оценка гранта осуществляется достаточно квалифицированно.

3. Нужны деньги, а они используются по другим программам, в которых отсутствует квалифицированное реферирование или провозглашаются ложные «инновации».

**Алексей Богданов, академик РАН, зам. директора НИИ физической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова**

**РФФИ ИЗМЕНИЛ ЛИЦО НАШЕЙ НАУКИ**

1. На средний грант РФФИ можно поддержать работу одного аспиранта (включая «довесок» к нищенской стипендии) и купить кое-что из реактивов и материалов. Не следует забывать, однако, что большие лаборатории, в которых есть несколько сильных групп с самостоятельной тематикой, как правило, получают больше одного

гранта. РФФИ всегда такую практику поддерживал; это вам не политика Роснауки «одна заявка на один лот» от одной, пусть и очень крупной организации. Поэтому у индивидуальных грантодержателей активно работающих лабораторий есть возможность объединить часть финансов на общие задачи.

Кроме того, практически во всех организациях грантодержатели отчисляют 15–20 % своего гранта на поддержку инфраструктуры (например, на поддержку работы компьютерного сервера) своего института или факультета. И это также идет им во благо. Не следует также забывать, что, получая грант РФФИ, исследователь тем самым получает и моральную поддержку. Его проект успешно прошел серьезную экспертизу, и его вес в глазах руководства, конечно, возрос.

2. Мне не очень удобно хвалить РФФИ, поскольку мне посчастливилось работать в этом фонде практически с момента его основания. Тем не менее, опираясь на опыт работы в других многочисленных экспертных советах – наших и международных, могу с полной уверенностью сказать, что ничего лучше и ценнее для российской науки, чем РФФИ, в нашем государстве просто не существует. Главное в РФФИ – это высокий профессионализм всех, кто принимает участие в его работе (начиная от рядовых экспертов и кончая сотрудниками аппарата фонда). Российское научное сообщество прошло большую школу РФФИ. Оно училось писать гранты, трезво оценивать перспективы и результаты своей работы, ценить международные публикации. РФФИ изменил лицо нашей науки.

3. Мне кажется, что РФФИ мог бы усовершенствовать формы поддержки молодых ученых. Сейчас фонд много помогает молодым в участии в международных конференциях (кстати, где еще можно получить такую поддержку?) и в организации молодежных конференций. В то же время т.н. программа «мобильности молодых ученых» (поддержка стажировок в других организациях внутри страны) работает вяло. Она неплохо финансируется. С моей точки зрения, эти средства более целесообразно использовать на поддержку первых самостоятельных грантов молодых уче-

ных (когда грант дается, в известной мере, авансом под хорошую идею).

**Ольга Лаврик, член-корр. РАН, зав. лабораторией биоорганической химии ферментов Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН**

**«СИСТЕМА РЕЦЕНЗИРОВАНИЯ В РФФИ НЕ УСТУПАЕТ МИРОВОМУ СТАНДАРТАМ»**

1. Размер грантов РФФИ действительно маленький, и очень плохо, что финансирование грантов на 2010 г. сокращено, вместо того чтобы его увеличить, ведь роль РФФИ очень велика для развития фундаментальных исследований в России и роста научных кадров. Это едва ли не единственный фонд поддержки научных исследований, где идет серьезное и основательное экспертное рецензирование проектов и ежегодное рецензирование отчетов по проектам. Причем если работа протекает неудовлетворительно, то финансирование прекращается досрочно. Есть, конечно, и другие программы (например, программа РАН «Молекулярная и клеточная биология»), где столь же серьезно, согласно рейтингу и качеству публикаций, присуждаются гранты, но все-таки РФФИ очень важен.

Не нужно забывать, что РФФИ существует и развивается уже много лет, проделана огромная работа и сложилось много хороших принципов отбора лучших проектов. Это прекрасный опыт, который и дальше нужно использовать для развития фундаментальных исследований. Было бы просто очередным преступлением это все перечеркнуть.

Важность грантов РФФИ еще и в том, что финансирование может получить не только завлаб, но и другие ведущие сотрудники, которые работают практически независимо, а также молодые ученые. Это принципиальный фактор: в рамках грантов РФФИ можно выполнять поисковые проекты, которые и являются сутью фундаментальных исследований.

2. В работе фонда нравится, как я уже отметила, система рецензирования грантов, а также относительная простота подачи заявок и отчетов. Все познается в сравнении. Вспоминается время, когда мы считали систе-



му РФФИ очень сложной. Но сейчас на фоне ужасной бюрократии при подаче заявок на поддержку исследований в Роснауку и отчетности по этим проектам система РФФИ выглядит весьма простой и доступной.

Мне кажется, что основные средства в РФФИ должны идти на финансирование базовых инициативных грантов, в этом случае они уже могли бы быть гораздо больше по размеру. Создание некоторых новых программ и конкурсов в РФФИ вплоть до научного сотрудничества с Южной Осетией не кажется мне оправданным. Кроме того, финансирование ориентированных проектов до известной степени дублирует работу Роснауки. Согласно своему названию, фонд должен в первую очередь поддерживать фундаментальные исследования.

3. Нужно, безусловно, увеличивать финансирование инициативных проектов, средний грант должен приблизиться по крайней мере к 1 млн руб. Следует сохранять и далее развивать сложившуюся систему рецензирования проектов. Она вполне объективна и не уступает мировым стандартам.

**Константин Северинов, д.б.н., профессор Университета Ратгерса, США, зав. лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов Института биологии гена РАН, руководитель группы регуляции экспрессии генов мобильных элементов прокариот Института молекулярной генетики РАН**

### **«РФФИ – ЛУЧ СВЕТА В НАШЕЙ НАУЧНОЙ ДЕЙТЕЛЬНОСТИ»**

1. Мне было интересно узнать среднюю сумму гранта (380 тыс. руб.) – мой грант РФФИ ниже среднего. Так как запрашивал я сумму гораздо большую, чем озвученное среднее, то я не могу не задуматься о причинах этого грустного для меня факта. Ответа я не знаю, но вижу такие варианты:

а) все заявки «срезаются» на определенный (очень большой) процент, и я по скромности исходно попросил меньше, чем мои коллеги;

б) другие исследователи предложили лучшие, достойные большего финансирования проекты (так как речь идет о среднем размере гранта, это означает, что работы в моей группе

проводятся ниже среднего российско-го уровня (или, вернее, среднего, фондируемого РФФИ);

3) решения о размере гранта принимаются не в связи с качеством заявки или размером требуемых заявителем сумм, а в соответствии с какими-то другими соображениями (например, «богатым американским дядюшкам» дают меньше для поддержания социальной справедливости).

Основная функция гранта РФФИ – выплата доплат аспирантам (одному, максимум двум). Дело в том, что РФФИ считается внебюджетным источником, а из бюджетных денег (программы РАН) аспирантам платить официально нельзя. Понять это невозможно, это надо просто запомнить и принять. На надбавки идет примерно половина гранта. Остальное – на всякие пластиковые пробирки, наконечники для пипеток и т.д.; мелочи, но жить без них нельзя. При желании, как правило, можно оплатить одну командировку на конференцию. Никакого оборудования купить, конечно, нельзя. Наконец, 15 % от суммы уходит в институт.

В целом грант РФФИ лучше иметь, чем не иметь, но он не позволяет проводить полноценные исследования по заявленным темам, нужны дополнительные средства. Если по результатам трехлетней поддержки грантом РФФИ у меня 4 статьи в международных журналах, в которых упомянут этот грант, не надо относиться к этому слишком серьезно. Да, средства гранта внесли свой вклад. Но результаты были бы получены и без гранта. А вот только на этот грант, скорее всего, ничего достойного получено не было бы.

У меня есть более крупный грант РФФИ («офи-ц»). Он мне больше нравится ровно в той пропорции, в какой он больше моего инициативного гранта. Больше денег – больше возможностей. Мы даже купили на него микробиологическую качалку за \$10 000.

2. У фонда прекрасный сайт (система «Грант-экспресс» начала работать до соответствующей системы НИИ и работает хорошо). Формы в целом все разумные, нет ощущения, что над тобой специально издеваются. Если только самую малость – например, когда в отчетах требуют привести списки ссылок из статей, поддержанных грантом.

Не понятно также, зачем требуют на исполнителей налоговую информацию, учитывая, что исполнители легко меняются по ходу дела. Приходится бегать за людьми, требовать у них ИНН и домашние адреса.

Безобразия, конечно, что не дают рецензий на заявки.

У РФФИ очень хорошая, очень нужная система поддержки поездок на конференции, ею успешно воспользовались несколько моих сотрудников. Правда, там тоже есть набор своих идиосинкразических требований, и сотрудницы фонда не всегда вежливы, когда обращаешься за справками, но охота публике неволи.

Фонд проводит серию совместных конкурсов с разными странами, от Киргизии до США. По-моему, это не самая лучшая часть его деятельности, наиболее закрытая. В ходе общения с администраторами таких программ с американской стороны я получил прямой совет не подавать заявку. Считаю, лучше все это свернуть и попытаться увеличить средний размер гранта, не уменьшая количество поддержанных заявок.

Полным анахронизмом представляется требование везти бумажную версию заявки или отчета через всю Москву, а для некоторых, вероятно, через всю страну, чтобы бросить в ящик «для писем и газет». Раз есть прекрасный сайт, зачем нужна бумажная волокита?

3. Как развивать? Ввести практики предоставления рецензий на заявки, сделать гласными списки экспертов, ввести принцип их ротации (*сейчас такой принцип действует лишь для членов экспертных советов, но не для внешних экспертов – И.С.*) и объявить критерии, по которым эксперты выбираются. Следовать этим принципам строго и последовательно. Пытаться увеличивать сумму грантов, но не за счет их сокращения. Все попытки выделить «приоритетные направления» и внедрить «целевое финансирование» чреваты злоупотреблениями, и чаще всего исходят от людей, способности которых эти направления выделить вызывают серьезные сомнения.

В целом, РФФИ – это луч света в нашей научной действительности. Его надо совершенствовать в мелочах, но менять основные принципы деятельности не стоит.

**Петр Чумаков, д.б.н., зав. лабораторией пролиферации клеток Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН**

**«РФФИ ДЛЯ БОЛЬШИНСТВА УЧЕНЫХ – ЕДИНСТВЕННАЯ НАДЕЖДА ПОЛУЧИТЬ ПОДДЕРЖКУ»**

1. Плачевное состояние нашей науки во многом обусловлено смехотворным по размерам финансированием. РФФИ является не единственным, но основным источником финансирования фундаментальной науки. Для большинства ученых, не приобщенных к каким-то влиятельным группировкам, а просто занимающихся наукой, РФФИ – единственная надежда получить поддержку. Конечно, при среднем размере гранта в 380 тыс. рублей невозможно сделать серьезную работу. Это раз в десять меньше того минимального финансирования, которое способно обеспечить работу в области экспериментальной физико-химической биологии. И это при условии, что оборудование уже существует.

Фундаментальные исследования имеют ценность только в том случае, если они дают новые данные. Стоимость получения новых данных определяется объективными условиями и зависит от цены на реактивы и на другие расходные материалы. В глобальном мире исследователи всех стран используют общие, стандартные источники материалов. К сожалению, эти материалы в основном производятся за рубежом, и то, что на Западе стоит \$1, у нас, за счет пошлин и прочих накруток, стоит \$1.5–2. Это значит, что стоимость научного результата в России значительно дороже. В США считается, что для успешной работы один активно работающий исследователь затрачивает 15–20 тыс. долларов в год только на материалы, без учета зарплаты и оборудования. Поэтому нашему исследователю, чтобы держаться на уровне, нужно тратить уже 25–30 тыс. долларов, или около миллиона рублей.

Из этого понятно, что грант размером 380 тыс. рублей годится только как средство для продления агонии науки. На эти деньги, тем не менее, наши ученые существуют и даже по-

лучают научные результаты. Но такая производительность труда не сравнима с реальными возможностями этих ученых. Только вера в светлое завтра заставляет их не сдаваться.

Когда возникает сложная финансовая ситуация, то остается надежда, что она будет преодолена, и все наладится. Но когда это безумие продолжается уже двадцать лет, и когда идет регресс, сворачивание ростков здоровой системы поддержки фундаментальной науки, открытых конкурсов, то возникает вопрос: чего мы ждем все эти годы? Особенно смешно и нелепо звучат заявления про «модернизацию» и «инновации». Откуда им взяться, если дерево рубят под корень?! Какие инновации вырастут из мертвой науки? Или кто-то изобрел новый «инновационный» способ доить инновации из воздуха?

2–3. Нравится:

- заявки на финансирование подаются самими исследователями, без оглядки на начальство. При такой системе исследователь действительно чувствует себя Российским Ученым, которому доверено раскрывать Таинства Мироздания;

- рассматривают заявки тоже ученые, а не чиновники. Основной критерий финансовой поддержки – научная значимость предлагаемого проекта;

- факт обладания грантом РФФИ делает исследователей более защищенными против произвола чиновников и представителей администрации институтов, которые не всегда руководствуются интересами развития науки;

- каждый исследователь имеет право распоряжаться средствами для выполнения проекта по своему усмотрению, никто не спрашивает, почему именно так были потрачены деньги. Эта система разумна, поскольку исследователь чувствует доверие, но в тоже время существование институтской бухгалтерской отчетности страхует от нецелевого использования средств;

- фондом устанавливаются ограничения на размер средств, которыми имеет право распоряжаться институт без согласования с грантодержателем. Это дополнительно защищает исследователей от произвола местного начальства;

- заявки и отчеты составляются по Интернету, с использованием унифицированных форм подачи. Заявки кратки по объему, что адекватно скудному объему финансирования. Если бы финансирование было большим, краткость в теории стала бы недостатком, поскольку потребовался бы более строгий спрос.

Не нравится:

- некоторая непрозрачность принятия решений о поддержке или отклонении проектов. Не хватает обратной связи в виде заключительного резюме по проекту, которое было бы доступно самому исследователю. Также следовало бы сделать доступным список и объем финансирования всех проектов, как текущих, так и завершенных, а также список членов тематического экспертного совета, участвующих в проведении заседания по результатам экспертизы;

- круг нашего научного сообщества очень узок, что создает неблагоприятные условия как в плане конфликта интересов, так и из-за соображений личного характера. При существующей системе экспертизы остается возможность для манипуляций и необъективных решений. Правильным было бы привлечение к экспертизе не только российских, но и зарубежных исследователей, тем более что значительная часть русскоязычных ученых сейчас работает за границей. Необходимо использовать их потенциал и стимулировать их причастность к делам на Родине;

- средства поступают с большим запозданием, причем в начальные месяцы года ученые просто оказываются без денег. Наша негибкая финансовая система не позволяет создавать легально какие-либо «зачапки» на время таких голодовок и тем самым толкает всех нас к неизбежному (если мы хотим, чтобы работа не встала) нарушению;

- хотелось бы иметь два-три типа грантов, различающихся по срокам выполнения и по объемам финансирования. Например, многие инициативные проекты не укладываются в три года – нужны и пятилетние гранты тоже. ●

# Программа фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине»

А.И. Григорьев

Координатор Программы

д.м.н., профессор, академик РАН и РАМН, вице-президент РАН

**П**рограмма фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», организованная в 2002 г., ежегодно утверждается Президиумом РАН. За восемь лет существования Программа продемонстрировала свою востребованность и эффективность, являясь одним из важнейших механизмов инновационной деятельности РАН. Программа носит междисциплинарный характер и ежегодно формируется на конкурсной основе. Целью Программы является использование результатов фундаментальных исследований в области естественных и точных наук для решения приоритетных задач практического здравоохранения, в первую очередь в рамках медицинских учреждений РАН. Основные задачи включают: а) исследование этиологии и патогенеза ряда распространенных и социально значимых заболеваний; б) разработка новых медицинских технологий – методов диагностики, медицинских приборов, изделий медицинского назначения и лекарственных препаратов; в) привлечение медицинских учреждений РАН к научно-техническим разработкам и клиническим испытаниям новых технологий; г) внедрение апробированных результатов программы в медицинские учреждения РАН и в российское здравоохранение в целом; д) повышение качества медицинского обслуживания сотрудников РАН. Учитывая то, что по данным ВОЗ в ближайшие 10–15 лет на первое место по числу больных выйдут неврологические и психические заболевания, оставив позади

доминирующие в настоящее время сердечно-сосудистые и онкологические заболевания, в 2010 г. в рамках программы создан блок проектов по исследованиям мозга.

Актуальность Программы определяется ее широкой социальной востребованностью и уникальной идеологией, направленной на внедрение достижений естественных и точных наук – биологии, химии, физики и математики в практическое здравоохранение путем объединения усилий научно-исследовательских институтов большинства отделений РАН. Многопрофильность институтов РАН и их высокий научный и кадровый потенциал позволяют проводить исследования и внедренческие работы в широком диапазоне – от углубления или получения новых знаний об этиологии и патогенезе социально значимых заболеваний до разработки и получения новых материалов и лекарственных средств. Кроме того, уникальная материально-техническая база учреждений РАН физического профиля позволяет конструировать и доводить до производства приборы медицинского назначения. Тактической задачей Программы является финансирование проектов, практическая реализация которых ожидается в ближайшие годы.

## НАУЧНО-ОРГАНИЗАЦИОННАЯ СТРУКТУРА ПРОГРАММЫ

Научно-организационное руководство Программой обеспечивается координатором и Научным советом во главе с председателем, назначаемым координатором (рис. 1). В состав Научного совета входят ведущие уче-

ные – в основном члены РАН и РАМН. Координатор и Научный совет вырабатывают идеологию развития Программы, осуществляют отбор проектов на конкурсной основе, определяют уровень их финансирования и оценивают результаты, полученные в ходе выполнения проектов. Работа координатора и Научного совета в значительной степени опирается на создаваемый ими Экспертный совет. В состав этого совета входят ведущие ученые РАН, РАМН, Минздравсоцразвития и других организаций, которые обеспечивают экспертизу проектов, поданных на конкурс, а также оценивают полученные в течение года результаты – сначала в качестве модераторов на секционных заседаниях ежегодных конференций по Программе, а затем в качестве рецензентов ежегодных отчетов. Связующим звеном между координатором и Научным советом, с одной стороны, и научными организациями – исполнителями проектов – с другой, является Координационный центр (рис. 1). На него возлагаются обязанности, связанные: а) с проведением конкурса проектов, б) с организацией ежегодной отчетной конференции, в) с получением ежегодных отчетов по проектам, г) с освещением работы Программы в средствах массовой информации и на сайте Программы в Интернете.

Программа быстро развивается, проявляя высокий динамизм. Так, в 2002–2003 гг. исследования проводились только по трем научным направлениям: а) исследования этиологии и патогенеза ряда распространенных и социально значимых заболеваний; б) разработка и усовершенствование



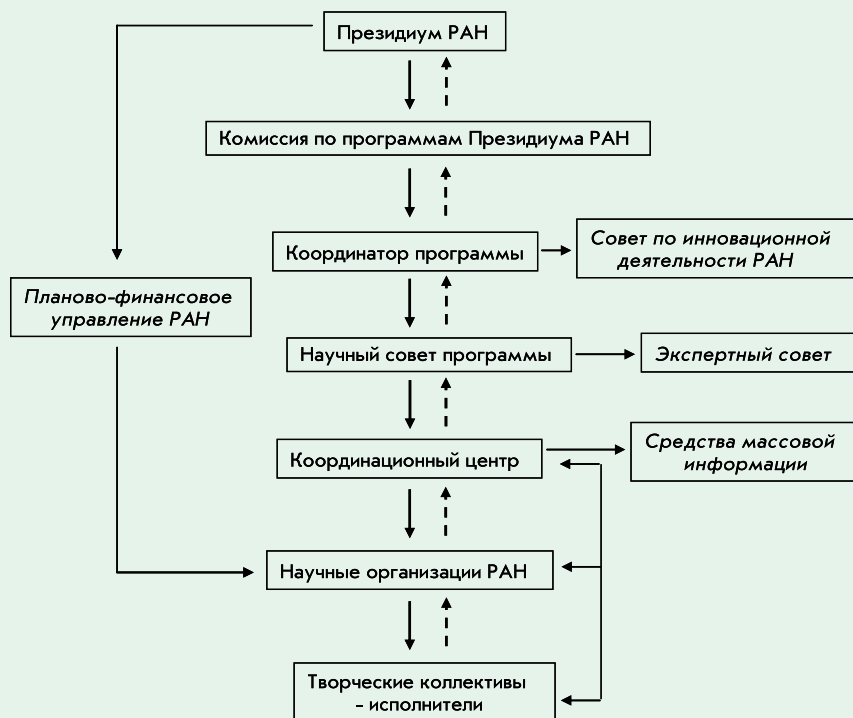


Рис. 1. Схема организации Программы «Фундаментальные науки – медицине»

ние методов и средств диагностики; в) создание приборов и материалов медицинского назначения, новых лекарственных препаратов. В 2004 году появилось новое направление «Современные проблемы радиобиологии», а в рамках прежних направлений сформировались наиболее перспективные разделы, посвященные хроническим нейродегенеративным заболеваниям (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и др.), биофотонике и информатике. С 2005 г. ряд инновационных проектов был объединен в отдельные блоки, в рамках которого осуществляются разработка, клинические испытания и внедрение новых медицинских технологий на базе медицинских учреждений РАН – ЦКБ РАН в Москве, а также больниц Научных центров РАН в Санкт-Петербурге, Пущино, Черноголовке, Троицке, Казани и в Кольском научном центре. В 2006 г. было сформировано новое направление «Полиморфизм человека», развивающееся и финансируемое совместно с МГУ им. М.В. Ломоносова. И наконец, в 2010 г. во исполнение решений Общего собрания РАН (декабрь 2009 г.) был сформирован блок проек-

тов по исследованиям мозга. Для дальнейшего развития программы существуют практически неограниченные ресурсы институтов РАН, однако ежегодно приходится отклонять десятки проектов, представляющих большой теоретический и практический интерес для медицины, из-за ограничений в финансировании Программы.

Динамизм Программы легко охарактеризовать количественно. Так, с 2002 по 2010 г.: число финансируемых проектов возросло с 37 до 187 – в 5 раз, количество организаций-участников увеличилось с 20 до 72 – в три с половиной раза, объем финансирования возрос от 30 до 100 млн руб. – более чем в 3 раза (рис. 2). В настоящее время в работе Программы участвуют институты восьми Отделений РАН, находящиеся в различных городах России – Москве, Санкт-Петербурге, Мурманске, Пущино, Нижнем Новгороде, Самаре, Казани, Черноголовке, Уфе. Учитывая инновационную направленность Программы, одним из ключевых показателей ее эффективности является количество поданных заявок на патенты и количество полученных патентов. С 2002

по 2010 г. эти показатели увеличились более чем на порядок (рис. 3).

Важнейшим элементом развития Программы центрального региона РАН является создание ее филиалов в региональных центрах РАН – в Сибирском, Уральском и Дальневосточном. Как упоминалось выше, итоги работы Программы подводятся на ежегодных конференциях поэтапно – сначала на конференциях Дальневосточного, Сибирского и Уральского региональных отделений РАН, а затем на объединенной конференции, включающей институты Центральной части РАН. В 2009 г. введена новая практика – проведение конференций по направлениям. Работа конференций вызывает большой интерес у научной и медицинской общности, а по их итогам проводятся пресс-конференции с представителями важнейших средств массовой информации – ИТАР-ТАСС, «Медицинской газеты», «Поиск», «Радио России», телевидения и др.

### КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОГРАММЫ

#### 1. Фундаментальные исследования этиологии и патогенеза ряда распространенных и социально значимых заболеваний.

В рамках этого направления наибольший прогресс достигнут в изучении этиологии и патогенеза нейродегенеративных заболеваний (НДЗ). НДЗ – болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, гиперпролактинемия и др., развивающиеся в результате гибели определенных популяций нейронов мозга, по частоте встречаемости и тяжести находятся в одном ряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями. Гибель нейронов приводит к дефициту синтезируемых ими химических сигналов и нарушению тех функций, в регуляции которых они участвуют. Первые симптомы НДЗ появляются после гибели большинства нейронов определенного типа, причем этот процесс запускается в возрасте 25–35 лет и продолжается 20–30 лет. Лечение, начинающееся только после появления симптомов, не приводит к выздоровлению больных, а сопровождается их инвалидизацией и гибелью. В рамках Программы впервые



Рис. 2. Основные показатели развития Программы

показано, что дефицит сигнальных молекул, возникающий в результате гибели синтезирующих их нейронов, компенсируется включением новых путей синтеза этих сигналов другими нейронами, что и объясняет развитие НДЗ в течение многих лет в досимптомной стадии (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН). В этом контексте появление симптомов является показателем необратимого разрушения соответствующей регуляторной системы мозга и истощения компенсаторных механизмов. Именно этим объясняется неэффективность современных методов лечения. Отсюда вытекает необходимость разработки диагностики НДЗ задолго до появления первых симптомов, а также профилактического лечения, направленного на остановку или хотя бы замедление гибели нейронов.

Новые важные данные были получены также при изучении этиологии и патогенеза других социально значимых заболеваний – легочной и сердечно-сосудистой недостаточности, сахарного диабета и туберкулеза.

**2. Разработка и усовершенствование методов диагностики и лечения.**

*Диагностика.* Созданы новые и усовершенствованы существующие методы диагностики и мониторинга широкого круга заболеваний – неврологических, эндокринных, сердечно-сосудистых, легочных и желудочно-кишечных. В этом контексте большое

внимание уделено исследованиям нарушения метаболизма в пораженных органах и тканях, что тестируется по специфическим эндогенным маркерам. К наиболее приоритетным направлениям относилась разработка неинвазивных методов диагностики. Среди них особое место занимают методы биофотоники, основанные на использовании термографии, эндодифлуоресценции и когерентной оптической томографии, которые особенно перспективны для диагностики онкологических заболеваний. Так, разработан и внедрен неинва-

зивный метод диагностики на основе оптической когерентной томографии, позволяющий проводить прицельную биопсию, определять границы патологической зоны во время операции, осуществлять мониторинг заживления ран. С этой целью сконструированы портативные томограф и микроскоп, обладающие высоким разрешением (Институт прикладной физики РАН).

Исследования патогенеза НДЗ, проведенные в рамках Программы, позволили поставить вопрос о необходимости разработки преклинической диагностики (см. ранее). Уже сейчас понятно, что диагноз в досимптомной стадии может быть поставлен с помощью позитронно-эмиссионной томографии. Это малодоступный и слишком дорогостоящий метод для использования при диспансеризации, который, тем не менее, может быть использован для диагностики в небольшой по объему группе риска. С этой целью в рамках Программы осуществляется поиск периферических маркеров досимптомной стадии НДЗ как в эксперименте, так и у больных с только что проявившимися симптомами. Это в перспективе позволит создавать группы риска при диспансеризации населения (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ЦКБ РАН). Разработка преклинической диагностики НДЗ откроет новые перспективы для поиска профилактической терапии.

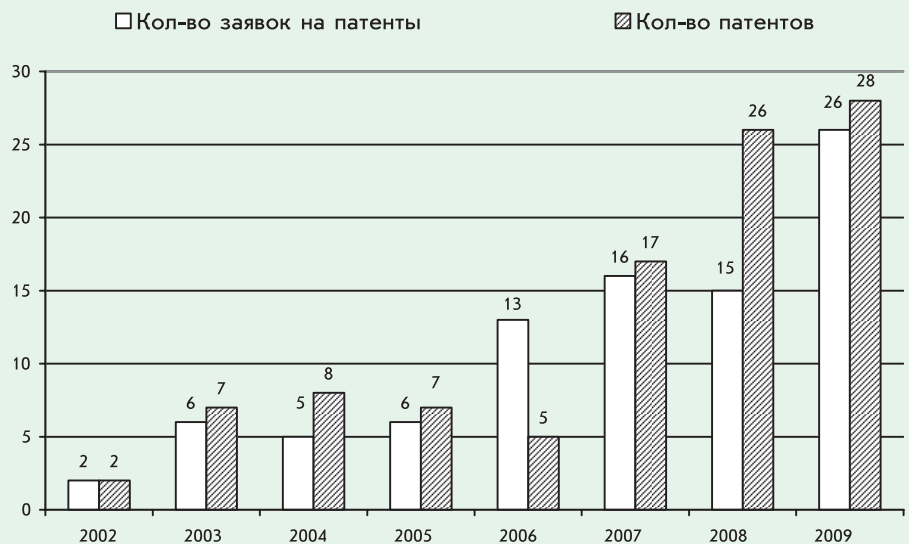


Рис. 3. Основные показатели эффективности Программы

Одним из достижений Программы является разработка ранней диагностики глазных заболеваний по появлению в крови арестина, одного из белков цикла фототрансдукции. Кроме того, показано, что обнаружение антител к S-антигену, одному из белков сетчатки, в крови позволяет прогнозировать развитие диабетической ретинопатии у больных с диабетом и посттравматических осложнений при ожоговой травме глаза (Институт биохимической физики РАН).

В последние годы разрабатываются новые подходы информатики к диагностике широкого круга заболеваний, что повышает достоверность поставленных диагнозов. Большое значение имеет разработка основ телемедицинской сети больных и профилактических центров (рис. 6), включая мобильную дистанционную функциональную диагностику (Институт биологического приборостроения РАН). Сеть предназначена для экстренной диагностики с привлечением крупнейших специалистов Москвы и Санкт-Петербурга, а также для мониторинга состояния больного.

Выполнены работы по разработке информационных технологий поддержки лечебно-диагностического процесса и созданию интегрированной информационной системы лечебно-профилактических учреждений на базе ЦКБ РАН (Исследовательский центр медицинской информатики Института программных систем РАН).

*Лечение.* На основе обнаруженной в эксперименте селективности транскраниального электровоздействия на защитную систему мозга, вырабатывающую эндорфины и серотонин, разработан лечебный метод транскраниальной электростимуляции (ТЭС-терапии). Это метод позволяет с помощью поверхностных электродов и токов специальной формы активировать работу защитных механизмов мозга, что позволяет его использовать для лечения широкого круга неврологических заболеваний (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН).

### 3. Создание приборов и материалов медицинского назначения, новых лекарственных препаратов.

*Приборы.* Усовершенствованы методы лечения больных путем создания необходимых для этого приборов, в том числе на основе воздействия

на биологические ткани лазерного излучения. Часть разработок доведена до клинических испытаний и внедрения разработанных новых лекарственных средств. Так, создан импульсно-периодический CO<sub>2</sub>-лазер для лечения кожных заболеваний – удаления папиллом и новообразований, устранения последствий ожогов (Институт общей физики РАН). Прибор прошел клинические испытания в трех ведущих дерматологических клиниках России. По техническим характеристикам прибор соответствует лучшим мировым образцам, при этом стоимость его в 10 раз меньше стоимости зарубежных аналогов.

Разработан малогабаритный компьютерный инфракрасный термограф, обладающий повышенными метрологическими характеристиками (Институт радиотехники и электроники РАН). На его основе в ряде медицинских учреждений Москвы созданы кабинеты инфракрасной диагностики и разработаны новые методики дифференциальной диагностики опухолей, заболеваний сосудистой системы, опорно-двигательного аппарата, маммографии. В частности, в рамках Программы изготовлен инфракрасный термограф и на его основе оборудован кабинет инфракрасной диагностики во 2-й поликлинике ЦКБ РАН.

Широкое применение методов криотерапии и криохирургии в практической медицине – в дерматологии, гинекологии, оториноларингологии, общей хирургии, онкологии, микрохирургии сдерживается в России отсутствием простых и надежных криомедицинских инструментов, предназначенных как для быстрого бесконтактного охлаждения (распылители жидкого азота), так и для глубокого контактного охлаждения выделенных участков на поверхности или в объеме ткани (криодеструкторы с охлаждаемым жидким азотом активным наконечником). В рамках Программы: а) осуществлен критический анализ опыта разработки и практического использования криораспылителей жидкого азота и криодеструкторов со сменным рабочим наконечником; б) модернизирована конструкция портативных криоприборов; в) изготовлены опытные образцы портативных азотных криораспылителей и криодеструкторов (Институт физики твердого

тела РАН), которые проходят клинические испытания в больницах Научных центров РАН в Черноголовке, в С.-Петербурге и ряде клинических учреждений г. Москвы.

*Материалы.* Получены новые результаты, направленные на использование химических или биологических материалов для замещения дефектов тканей организма или эндопротезирования суставов и кровеносных сосудов. Так, созданы новые матричные материалы на основе природных полисахаридов для культивирования клеток кожи человека и трансплантации их при заживлении ран (Институт высокомолекулярных соединений РАН и Институт цитологии РАН). Установлено, что наиболее перспективными полимерными материалами для культивирования фибробластов и кератиноцитов кожи человека являются пленочные композиционные матрицы на основе хитозана, модифицированного коллагеном. Разработана технология перфорирования пленочных матриц с помощью лазерного излучения.

*Лекарства.* Получено экспериментально-клиническое обоснование применения отечественного препарата КСИМЕДОН для профилактики вторичных иммунодефицитов (Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КНЦ РАН). На основании способности этого препарата нормализовать соматический статус ВИЧ-больных, уменьшать репликацию ВИЧ (вирусную нагрузку) и улучшать патогенетически значимые при ВИЧ-инфекции параметры иммунного статуса определены критерии и схемы назначения препарата в качестве средства патогенетической терапии при ВИЧ-инфекции. Таким образом, впервые для лечения ВИЧ-инфекции использован негликозидный аналог пиримидин-нуклеозидов с низкой токсичностью.

Создана новая оригинальная группа соединений, представляющая большой практический интерес для лечения болезни Альцгеймера и некоторых других НДЗ (Институт физиологически активных веществ РАН).

### 4. Современные проблемы радиобиологии.

Проведены исследования действия ядер высоких энергий и низкоинтенсивного облучения на живые объекты



(Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН). Разработаны новые технологии облучения живых организмов, в том числе снижающие негативное воздействие лучевой терапии (Институт проблем управления им. В.А. Трапезникова РАН). Получены препараты природного происхождения, эффективно снижающие радиационно-индуцированные повреждения в клетках человека (Институт нефтехимического синтеза РАН, Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН). Разработаны критерии устойчивости организма человека к экстремальным воздействиям (Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН). Значительные усилия были сосредоточены на конструировании новых приборов, в частности дозиметра нового поколения и источника облучения (Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН). В последнее время это направление было реорганизовано, а проекты включены в другие направления по тематическому признаку.

#### 5. Полиморфизм человека.

Проекты в рамках этого направления посвящены фундаментальным исследованиям индивидуального разнообразия биомакромолекул человека на генетическом и белковом уровнях. В области структурно-функциональной и эволюционной геномики человека проведено сравнительное изучение – клонирование, секвенирование и анализ полиморфизма – предпромоторной области рибосомальной ДНК человека и высших приматов (Институт биологии гена РАН). Выявлены сходные области и существенные различия, связанные с единичными заменами, инсерциями, делециями и структурными реорганизациями. Высказаны предположения о стартовом механизме эволюции генома. Разработан новый экспериментальный подход к технологии полногеномной идентификации инсерционных полиморфизмов ретроэлементов, характерных для генотипов пациентов с онкологическими и аутоиммунными заболеваниями, на основе которого выполнен первый, в масштабах целых геномов, поиск и последующий анализ

видоспецифических и полиморфных интеграций ретроэлементов, предложен новый метод генотипирования и начато исследование воздействия ретроэлементов на экспрессию генов (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). В последнее время это направление было реорганизовано, а проекты включены в другие направления по тематическому признаку.

#### 6. Инновационные клинические проекты.

Значительная часть фундаментальных исследований в рамках Программы проводится совместно с медицинскими учреждениями РАН, и их результаты уже внедряются в повседневную лечебную практику. Так, совместно с ЦКБ РАН (Москва) проведены: а) исследования и разработка современных методов профилактики и терапии рака предстательной железы с использованием новой лекарственной субстанции Миколикопин; б) исследования полисахаридных комплексов мицелиальных грибов, используемых в качестве пищевых волокон в лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта; в) разработка и внедрение аппаратно-программного лечебно-диагностического комплекса для восстановления ходьбы «Вертикаль»; г) разработка и внедрение в медицинскую практику лазериндуцированной гипертермии щитовидной железы в лечении узлового зоба; д) разработка и внедрение методов индивидуальной диагностики побочного действия кислорода с оценкой его действия в комплексе с лекарственной терапией; е) разработка и внедрение технологии комплектования диагностических медицинских термографических кабинетов, включая мобильный; ж) внедрение иммунохроматографической тест-системы на полимерных мембранных носителях для комплексной экспресс-диагностики вирусных гепатитов; з) разработка программно-аппаратного комплекса средств объемной визуализации изображений эндоскопии патологических зон органов малого таза. Одним из наиболее важных разделов программы является создание интегрированной информационной системы лечебно-профилактических учреждений: впервые использован телевизионный метод эндоскопического

бесконтактного измерения линейных размеров внутрисполостных объектов. Сформулированы основные принципы, на которых должны основываться интегрированные медицинские информационные системы, разработана концептуальная модель единой электронной медицинской карты.

Таким образом, Программа «Фундаментальные науки – медицине», используя потенциал восьми отделений РАН и институтов ее региональных отделений, вносит существенный вклад в изучение этиологии и патогенеза социально значимых заболеваний, в разработку и усовершенствование методов диагностики, в конструирование приборов и материалов медицинского назначения, поиск новых лечебных технологий и лекарственных средств и, в итоге, в укрепление академического и российского здравоохранения.

*Статья посвящается светлой памяти академика О.Г. Газенко – одного из организаторов и идеологов Программы, бессменного председателя ее Научного совета*

#### **КОММЕНТАРИИ КУРАТОРОВ ОТДЕЛЬНЫХ НАПРАВЛЕНИЙ ПРОГРАММЫ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕЗИДИУМА РАН «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ НАУКИ - МЕДИЦИНЕ»**

##### **Академик РАН Владимир Юрич Андреевич, куратор направления «Биофотоника»:**

Возникновение направления «Биофотоника» было вызвано желанием и возможностью использовать для диагностики и лечения болезней человека современные достижения в области фотоники как физической и инженерной науки, которые включали в себя 1) создание мощных и разнообразных лазеров, 2) создание чувствительных приемников света, как интегральных, так и с пространственным разрешением (матриц), и наконец 3) разработку компьютерных технологий построения трехмерных изображений живых объектов как на макро- (томография), так и микро- (конфокальная микроскопия) уровнях. Целью проекта была координация ис-

следований в этой области и разработка на основе этих достижений новых медицинских технологий.

На первом этапе была осуществлена инвентаризация исследований в области биофотоники путем сбора и анализа предложений от лабораторий академических институтов. Значительная часть этих предложений была поддержана, причем вначале практически единственным критерием был общий научный уровень проектов. В результате тематика проектов была довольно пестрой и некоторые проекты, будучи хорошими научными разработками, не заканчивались созданием конкретного продукта. После создания координационного совета по программе отбор проектов и текущий контроль за их выполнением стал значительно жестче. В частности, по проблеме «Биофотоника» был подобран коллектив квалифицированных независимых экспертов, преимущественно из учреждений, не входящих в систему РАН, в том числе из вузов и медицинских учреждений. Общее число экспертов было большим, так что каждый эксперт рецензировал не более трех-четырёх работ. Экспертиза была полностью закрытой, эксперты ничего не знали друг о друге, и их имена никому не были известны. Опыт показал, что тем не менее практически всегда позиции двух-трех экспертов, которым направляли работы, совпадали, так что у Совета не было проблем с принятием однозначного решения о финансовой поддержке того или иного проекта. Была введена система заслушивания и обсуждения всех проектов не менее двух раз в год, один из них проводили во время работы крупной научной конференции или симпозиума. В результате многократных обсуждений в 2008 г. участники выработали скоординированный план дальнейших исследований, включающий в себя три основные задачи:

Разработку лазерных технологий для визуализации живых структур.

Создание светопоглощающих наноматериалов для фототермического разрушения раковых клеток в организме больных и для биохимических анализов с использованием явления плазмонного резонанса в наночастицах.

Разработку новых сенсбилизаторов для фотодинамической лазерной терапии раковых опухолей и методов контроля за их эффективностью.

Программа «Фундаментальные науки – медицине» представляется интересной не только из-за непосредственных результатов, важных как для самой фундаментальной науки, так и для практики. Ее организация показала эффективность нового принципа работы Академии наук, включающего в себя, с одной стороны, демократическое, рациональное и эффективное направление финансовых средств коллективом ученых на основе предложений «снизу» и независимой экспертизы проектов, а с другой стороны – научно-обоснованное планирование работ и жесткий контроль над выполнением проектов на всех этапах работы.

**Академик РАН Кузнецов Николай Александрович, куратор направления «Информатика»**

Программа Президиума Российской академии наук «Фундаментальные науки – медицине» координирует работы институтов 8 отделений РАН, а также многочисленных институтов Российской академии медицинских наук и учебных институтов, которые являются соисполнителями проектов Программы, вследствие чего значение Программы трудно переоценить. Рассмотрим это на примере секции биомедицинской информатики. Работы в этой области можно условно разбить на два класса: 1) экспертные системы для целей диагностики и прогнозирования результатов лечения пациентов, 2) компьютерная геномика.

Для компьютерной поддержки диагностических и прогнозных решений разрабатывается широкий класс экспертных (партнерских систем) для самого широкого класса заболеваний. Основная идея построения таких систем состоит в обобщении опыта высококвалифицированных специалистов с использованием информационного материала, накопленного в учреждениях здравоохранения, медицины и биологии, связанного с обследованием и анкетированием пациентов, исследованием разных заболеваний и схем их лечения. Для построения программного обеспечения подобного рода экспертных систем используется

весь спектр математических методов, таких как теория алгоритмов, методы распознавания, математическая логика, оценивание и управление в условиях неопределенностей и т.д.

Разработка методов, алгоритмов и программного обеспечения для таких систем проводится, в основном, институтами Российской академии наук, таких как Государственный научный центр РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Вычислительный центр РАН, Институт прикладной математики РАН, Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Институт программных систем РАН, Институт системного программирования РАН, Институт управления им. В.А. Трапезникова РАН, Институт вычислительной математики РАН, Институт вычислительных технологий Сибирского отделения РАН, Институт автоматизации и электроники Сибирского отделения РАН, Институт систем обработки изображений РАН, Санкт-Петербургский институт информатики РАН, и в университетах и институтах Министерства образования и науки РФ: Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, Санкт-Петербургском университете, Московском физико-техническом институте, Московском государственном техническом университете им. Баумана и др., в содружестве с институтами Российской академии медицинских наук, институтами отделения биологических наук РАН и другими учреждениями медицины и здравоохранения.

В области компьютерной геномики проводятся работы, посвященные распознаванию генов и регуляторных сайтов, предсказанию структуры РНК, аннотаций генов и геномов, анализу регуляторных сигналов, анализу экспрессий генов, моделированию метаболических и регуляторных сетей, рациональному проектированию лекарств. В этих работах используется широкий спектр математических методов и различная вычислительная техника – от персональных до суперкомпьютеров. Работы проводятся в институтах Российской академии наук, таких как Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Ин-

ститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институт белка РАН, Институт цитологии и генетики СО РАН, Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Институт математических проблем биологии РАН, Институт цитологии РАН (г. Санкт-Петербург), в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова и Санкт-Петербургском политехническом университете, а также в университетах и институтах Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию: Институте физико-химической медицины Росздрава, ГНЦ Институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов, ГосНИИГенетика.

Перечень институтов и университетов, в которых проводятся исследования в области биомедицинской информатики, весьма многочислен, но далеко не полон, и приведен он здесь для того, чтобы показать актуальность и необходимость эффективного решения проблемы координации работ в этой области. К сожалению, в силу ограниченности финансирования в Программе РАН «Фундаментальные науки – медицине» в секции «Биомедицинская информатика»

проводятся исследования только по 8 проектам, поэтому программная координация в области биомедицинской информатики достаточно ограничена. Реальная координация работ в этой области ведется на уровне семинаров, конференций, симпозиумов, которые инициируются Советом Программы. Для эффективной координации фундаментальных исследований в области медицины следует придать Программе «Фундаментальные науки – медицине» межотраслевой статус при существенном увеличении объемов финансирования.

**Д.ф.-м.н. Обухов Юрий Владимирович, куратор направления «Приборы»**

В институтах Российской академии наук с конца 70-х годов активно начали развиваться исследования и разработки медицинского назначения. Под руководством таких известных ученых, как академики А.М. Прохоров, Н.Д. Девятков, Ю.В. Гуляев и др. были развиты новые направления лазерной медицины, радиофизических методов диагностики и лечения, магнитной кардиографии и энцефалографии и многие другие, как принято сейчас говорить, инновационные медицинские технологии. К середине

90-х годов в РАН медицинское приборостроение сложилось в весьма обширное направление исследований и разработок, поэтому создание программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» было объективно необходимым, в том числе с точки зрения концентрации усилий и ресурсов на наиболее актуальных направлениях фундаментальных исследований и инноваций в области медицинского приборостроения.

В настоящее время в рамках приборного раздела программы выполняется 14 проектов. В их выполнении принимают участие организации РАН Москвы (6 институтов), Санкт-Петербурга (2 института), Пущинского, Троицкого и Ногинского научных центров (4 института), Казани и Нижнего Новгорода. Здесь не учитываются работы региональных отделений РАН. В качестве соисполнителей в проектах участвуют медицинские организации, общее число которых составило более 30. Разрабатываемые приборы и методы проходят испытания в клиниках. Результаты работ по проектам докладывались на международных и всероссийских конференциях и демонстрировались на специализированных выставках. ●



# 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



УДК 57.085.23:576.536

# Механизмы гравитационной чувствительности остеогенных клеток-предшественников

Л.Б. Буравкова, П.М. Гершович, Ю.Г. Гершович\*, А.И. Григорьев

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

\*E-mail: juliet\_g@mail.ru

**РЕФЕРАТ** В обзоре представлен подробный анализ современных данных о механической и гравитационной чувствительности остеобластов и остеогенных клеток-предшественников *in vitro*. Обобщены многочисленные примеры реакций клеток остеобластического фенотипа и остеогенных клеток-предшественников и особенности их функционирования в ответ на изменение механического и гравитационного окружения. Обсуждаются возможные пути передачи сигналов и механизмы гравитационной восприимчивости остеогенной клетки. Показано, что наиболее ранние мультипотентные стромальные клетки-предшественники костного мозга взрослого организма могут быть чувствительны к изменению напряженности механического и гравитационного поля в модельных условиях, что может иметь определенное значение в механизмах развития остеопении в невесомости.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** остеопения, гравитационная чувствительность клетки, микрогравитация, остеобласты, остеогенные клетки-предшественники, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, дифференцировка, цитоскелет.

В ходе эволюции костная система наземных позвоночных формировалась в среде, где одним из главных и неизменно действующих факторов является гравитация, определившая морфогенез и строение населяющих сушу существ. Определенные отделы скелета участвуют в поддержании позы и совершении активных локомоций, постоянно испытывая статические и динамические нагрузки «под знаком преодоления влияния силы тяжести». С началом освоения человеком космического пространства вопрос о влиянии микрогравитации на костную систему приобрел особую значимость, поскольку при недостатке механической нагрузки (микрогравитация, гипокинезия, гиподинамия, иммобилизация) масса костной ткани может уменьшаться в результате снижения потока механических импульсов и опосредованных гравитацией деформаций, как следствие нарушения сопряжения процессов костного ремоделирования [1, 2].

Работы, выполненные в последнее десятилетие, убедительно продемонстрировали чувствительность культивируемых клеток остеобластического фенотипа к фактору микрогравитации [3–8]. Открытым остается вопрос: как может влиять микрогравитация на различные аспекты функционирования менее зрелых клеточных форм, а именно прогениторных клеток.

В постнатальном развитии основным источником клеток-предшественников является костный мозг, который в своем формировании и функционировании тесно связан с костной тканью. Среди многочисленных компонентов

стромы костного мозга выделяют минорную популяцию клеток, которые локализуются в периваскулярной области костного мозга, но отличаются от эндотелиальных и гладкомышечных клеточных элементов экспрессией некоторых поверхностных антигенов и способностью дифференцироваться в клетки тканей мезенхимного происхождения, т.е. обладают всеми характеристиками мультипотентных мезенхимальных стволовых/стромальных клеток (ММСК) [9, 10]. Впервые полученные из костного мозга животных в 70-х годах XX в. А.Я. Фриденштейном с коллегами, позднее ММСК были обнаружены и выделены из костного мозга человека. Целый ряд исследований продемонстрировал, что *in vitro* ММСК способны дифференцироваться в клеточные элементы костной, хрящевой и жировой тканей, а также поддерживать и регулировать гемопоэз [11–13]. Хорошо известно, что остеобласты различной степени зрелости могут обладать неодинаковым уровнем восприятия механического воздействия [14, 15], в то же время представления о механизмах гравитационной чувствительности наименее коммитированных клеток, локализованных в костной ткани, только недавно получили свое развитие.

## ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ ВЛИЯНИЯ ГРАВИТАЦИОННОГО ФАКТОРА НА УРОВНЕ КЛЕТКИ

Сопоставление результатов, полученных в опытах на клетках и тканях *in vitro*, с изменениями, происходящими в организме человека под влиянием микрогравитации, позволяет дифференцировать и оценить роль собственно кле-

точных реакций в развитии тех или иных физиологических реакций, вне влияния интегративных регулирующих систем организма. Эволюция взглядов на возможность существования гравитационной чувствительности клетки *per se* представлена в ряде работ [16–20]. Дискуссии относительно способности изолированной клетки или клеточной популяции *in vitro* воспринимать изменения гравитационного поля не утихают и по сей день. Тем не менее накоплен обширный экспериментальный материал, который неоспоримо свидетельствует в пользу чувствительности различных типов культивируемых клеток к гравитационному фактору. В частности, показано, что в условиях микрогравитации у клеток развиваются многочисленные, часто обратимые морфофункциональные изменения, включающие ремоделирование элементов цитоскелета, изменение экспрессии генов и мозаичную перестройку внутриклеточных систем регуляции, подробный анализ которых представлен в обзорах [5, 19, 21, 22].

По-видимому, в неспециализированных клетках млекопитающих все же существуют структуры, которые могут претендовать на роль «гравитационных сенсоров» и «чувствовать» величину напряженности механического поля, а многие внутриклеточные процессы могут быть зависимыми от величины силы тяжести. Наиболее вероятными кандидатами на роль этих структур выступают различные элементы цитоскелета, ядро, внутриклеточные органеллы, а также некоторые поверхностные рецепторы клеток (интегрины), взаимодействующие с отдельными компартментами цитоскелета и со структурами внеклеточного матрикса. Эти структуры способны воспринимать возникающие в матриксе напряжения и деформации под действием гравитационного или механического воздействия, передавая их внутриклеточным посредникам, которые опосредуют соответствующую реакцию клеток на микрогравитацию [18, 23, 24]. На основе некоторых теоретических и практических выкладок предполагается, что гравитационная чувствительность клеток, растущих в культуре на твердом субстрате, есть функция от двух переменных параметров: степени адгезии клеток к субстрату и надежности межклеточных взаимодействий, а реализация этих взаимодействий находится в прямой зависимости от затрачиваемых на них энерготрат [17]. Опосредованное влияние микрогравитации на клеточном уровне может проявляться в изменении физико-химических параметров среды обитания клеток, и прежде всего процессов конвекции, седиментации и разности концентрационных градиентов, которые являются гравитационно-зависимыми и, следовательно, могут по-другому протекать в условиях микрогравитации [20, 25].

### **МЕХАНИЧЕСКАЯ И ГРАВИТАЦИОННАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК КОСТНОЙ ТКАНИ: ВЛИЯНИЕ НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК**

Долгое время в науке доминировали представления о том, что остециты и сохраняющие с ними контакты зрелые неактивные остеобласты являются наиболее вероятными механосенсорными клетками костной ткани [14, 15]. Предполагается, что этот процесс реализуется с помощью клеточных контактов, образованных интегринами, которые взаимодействуют внутриклеточно с элементами актинового цитоскелета клетки (актин, винкулин и т.п.), а вне-

клеточно – с различными белками внеклеточного костного матрикса, формируя непрерывную сеть, пронизывающую остециты и костный матрикс, и что такая всеобъемлющая и всепроникающая структура способна воспринимать и потенцировать действие даже ничтожно малых механических стимулов [26].

На культурах костных клеток было показано, что такие виды механической стимуляции, как пульсирующий поток жидкости (pulsatile fluid flow) или механическая деформация (strain), могут служить стимулом для запуска каскада регуляторных реакций, включая транзиторное увеличение продукции низкомолекулярных мессенджеров, таких как оксид азота – NO, экспрессию индуцибельной простагландин-синтазы (Cox-2) и секрецию простагландинов (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>), необходимых для увеличения внутриклеточной концентрации кальция и запуска инозитол-3-фосфатного пути [27], а также увеличения уровня цАМФ и IGF-I и запуска процессов пролиферации и дифференцировки костных клеток [15], либо активации костного (ре)моделирования [28]. Тем не менее эффекты, вызываемые различными видами механостимуляции, не равнозначны [29, 30], а клетки различной степени зрелости могут как одинаково [28], так и по-разному отвечать на одни и те же механические воздействия [14, 15]. Такая избирательность и варибельность реакций костных клеток на различные виды стимуляции, по-видимому, обусловлена как неодинаковой локализацией дифференцирующихся и зрелых клеток в пределах костной ткани *in situ*, так и разным уровнем их зрелости и спектром выполняемых ими функций.

Известно, что пролиферативная активность остеобластов регулируется широким набором биологически активных веществ, а также механическими сигналами. В частности, показано, что активация экспрессии Cox-2 и продукция PGE<sub>2</sub> происходит у остеобластов в ответ на действие факторов роста (TGF-β) и необходима для перехода клеток из G1-фазы в S-фазу репликации ДНК и последующей активной пролиферации [5]. Интересно, что как механическая стимуляция различного характера, так и гипергравитация [31] способны вызывать увеличение продукции PGE<sub>2</sub>, что свидетельствует о значении PGE<sub>2</sub> в анаболическом действии механического стресса. Удивительно и то, что в некоторых исследованиях, выполненных в условиях микрогравитации, было выявлено как увеличение продукции PGE<sub>2</sub>, так и уменьшение экспрессии мРНК Cox-2 и продукции PGE<sub>2</sub> на фоне пониженного роста клеток в условиях микрогравитации [5], что сопровождалось нарушениями в структуре актинового цитоскелета клеток.

Исследования, посвященные изучению влияния механического стресса на прогениторные клетки, представляют особый интерес. Установлено, что ММСК человека экспрессируют как Cox-1, так и Cox-2, причем вырабатывают PGE<sub>2</sub> на более высоком уровне, чем полученные из них остеобластоподобные клетки. Кроме того, обнаружено, что повышенная продукция данного метаболита у ММСК связана с более высоким уровнем экспрессии мембранно-связанной простагландин-синтазы, причем эндогенная продукция PGE<sub>2</sub> регулирует у них выработку остеогенного фактора роста – BMP-2 [32]. По-видимому, ММСК наряду со зрелыми остеобластами и остеоцитами вполне могут претендовать на роль механочувствительных клеток кост-

ной ткани, поскольку анизотропная одноосевая механическая деформация ММСК, высаженных на специальные эластичные мембраны, приводит к глобальному изменению паттерна экспрессии генов, снижает активность некоторых путей сигнальной трансдукции (Jagged1) и активирует клеточную пролиферацию [33]. Таким образом, доминировавшие некоторое время в науке представления о том, что низкодифференцированные клетки костной ткани не могут или практически не способны воспринимать механические стимулы, очевидно, должны быть существенно скорректированы. Следует отметить, что данные, описывающие изменения пролиферативной активности клеток остеобластического фенотипа в условиях измененной гравитации, достаточно противоречивы. Описано ингибирование пролиферации остеобластных клеток, как в условиях микрогравитации, так и при ее моделировании [6, 34, 35]. Использование модели Random Positioning Machine (RPM) не приводило к ухудшению роста преостеобластов мыши 2Т3 [36]. Пролиферативная активность ММСК в процессе их остеогенной дифференцировки в ротационном био-реакторе не менялась [37], уменьшалась при экспозиции на клиностае [38] и даже возрастала при культивировании на 3D-клиностае [39].

По-видимому, наиболее вероятным сценарием влияния микрогравитации на остеогенные клетки-предшественники является изменение нормальной реакции клеток на анаболическое действие факторов роста. В настоящее время многие исследователи придерживаются мнения о том, что наблюдаемые клеточные реакции обусловлены не физической потерей рецепторов для факторов роста (например, EGF, PDGF), а, скорее, изменениями в системе трансдукции сигналов в условиях микрогравитации [5, 40]. Эта точка зрения заставила ученых обратить самое пристальное внимание на возможные внутриклеточные механизмы и пути сигнализации. По современным представлениям, главные пути реализации всех трех основных направлений дифференцировки ММСК включают активацию/репрессию MAP-киназных каскадов (митоген-активируемых протеинкиназ) [41]. Показано, что активация классического MAP-киназного каскада (ERK1/2) происходит главным образом через Ras-зависимый путь сигнальной трансдукции в ответ на связывание рецепторов с факторами роста [41]. Предполагается, что такие факторы роста, как BMP-2 и IGF-I, реализуют свое позитивное митотическое влияние на ММСК через активацию MAP-киназного каскада, кроме того, в этом процессе задействована протеинкиназа D, но не протеинкиназа C [42]. Интересно, что увеличение пролиферации ММСК при действии пульсирующего потока жидкости также происходит за счет кальциевой сигнализации и MAP-киназного каскада, что свидетельствует о наличии универсального механизма трансформации механических сигналов в биохимические у остеогенных клеток-предшественников различной степени зрелости [43].

### **РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ АДГЕЗИИ В РЕГУЛЯЦИИ РАЗЛИЧНЫХ АСПЕКТОВ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И ВОСПРИЯТИИ МЕХАНИЧЕСКИХ И ГРАВИТАЦИОННЫХ СТИМУЛОВ**

Весьма важным может быть вопрос о сохранности иммунотипа клеток-предшественников в условиях изменен-

ной гравитации. Изучаемый вопрос интересен с нескольких точек зрения: во-первых, основные CD-кластеры, экспрессируемые на мембране ММСК, регулируют различные стороны функционирования клеток-предшественников, поскольку представляют собой поверхностные рецепторы для факторов роста, опосредуют взаимодействия ММСК с гемопоэтическими предшественниками и лимфоцитами и таким образом модулируют созревание и активность последних, принимают участие во взаимодействии клеток с молекулами внеклеточного матрикса [11, 13, 44]. Во-вторых, до сих пор не прояснена роль тех или иных антигенов в реализации уникальных дифференцировочных потенциалов стволовых клеток. Примеры того, может ли влиять моделированная микрогравитация на экспрессию отдельных поверхностных маркеров ММСК, весьма малочисленны и противоречивы. В частности, в одной работе было установлено, что 7-суточное 3D-клиностамирование приводит к увеличению количества клеток в популяции ММСК человека, экспрессирующих антигены стромальных клеток – CD44+, CD90+, CD29+ [39]. В другом исследовании было показано, что 6-суточное горизонтальное клиностамирование вызывает уменьшение числа клеток, несущих антигены CD105 и HLA A,B,C, в культуре ММСК костного мозга человека [45]. Нами было установлено, что 5-суточная экспозиция ММСК на RPM приводит к увеличению доли клеток, экспрессирующих интегрин CD49b, но не влияет на процентное содержание клеток, несущих CD29 [46].

Пожалуй, самым интересным аспектом биологических особенностей иммунотипа остеогенных клеток-предшественников является потенциальное участие определенных антигенов в механизмах механо- и гравиточувствительности. Сформулирована механохимическая гипотеза, согласно которой интегрины и другие рецепторы на поверхности клеток играют важную роль в физическом взаимодействии между внеклеточным матриксом и цитоскелетом клетки и восприятии гравитационных сигналов [23, 24]. В комплексном исследовании, посвященном изучению молекулярных функций интегринов, было показано, что простая кластеризация интегринов на мембране клеток в ответ на сигналы, поступающие из внеклеточного матрикса, является триггером трансмембранной аккумуляции 20 важнейших медиаторов сигнальной трансдукции, включая эффекторные белки цитоскелета – RhoA, Rac, Ras, Raf, MAP-киназа – MEK, ERK и JNK, причем применение цитохалазина D и ингибиторов тирозин-киназ не предотвращало агрегации интегринов с FAK и белками цитоскелета – винкулином, талином и  $\alpha$ -актинином [47].

Наиболее любопытна потенциальная роль некоторых из описанных антигенов в реакции костных клеток на резкое уменьшение «напряженности» механического поля. Доказательство того, что интегрины (в частности,  $\beta$ 1-интегрин или CD29) принимают участие в восприятии механических сигналов остеобластами, было получено при исследовании мышцей, имеющих нормальный уровень экспрессии  $\beta$ 1-интегрина, и трансгенных животных, в геном которых был встроена доминантно негативный ген  $\beta$ 1-интегрина. Взрослые 2-месячные трансгены имели остепененный фенотип и характеризовались значительным уменьшением массы костной ткани нижних конечностей, а также ухудшением ее силовых и прочностных характеристик при нормаль-

ном уровне костного ремоделирования [48]. Показана активация экспрессии альфа2-интегрина в ходе остеогенной дифференцировки ММСК при моделировании эффектов микрогравитации [49].

В фокусе современных исследований механобиологии находятся не только интегрин, но и другие рецепторы клеточной адгезии, и в особенности CD44 (НСАМ). На культуре остеобластов MC3T3-E1 показано, что механический стресс, вызываемый пульсирующим потоком жидкости, способен приводить к увеличению уровня мРНК остеопонтина, одного из широко распространенных белков костного матрикса, который является лигандом CD44 [50]. Мыши, дефицитные по гену *OPN*, демонстрируют резистентность к уменьшению механической стимуляции в ходе вывешивания и теряют меньше костной массы, чем мыши дикого типа. ММСК из костного мозга вывешенных *OPN*-мышей, культивируемые *ex vivo*, характеризуются нормальной способностью к образованию минерализованных нодулл по сравнению с пониженной минерализацией в культурах, выделенных из обычных мышей после их вывешивания [51]. В этой связи интересно, что 5-суточная экспозиция остеобластов крысы в условиях микрогравитации приводила к уменьшению уровня экспрессии остеопонтина, однако увеличивала уровень экспрессии CD44, при этом экспрессия  $\beta 1$ -интегрина (CD29) в клетках не изменялась [7].

Известно, что CD44 вовлечен в процессы связывания и регуляции активности матриксных металлопротеиназ (MPPs) [52]. ММСК экспрессируют и продуцируют различные типы MPPs (- 2, 3, 10, 11, 13, 14), а механический стресс приводит к возрастанию активности, прежде всего коллагеназы (MPP-13), причем это происходит на посттрансля-

ционном уровне [53]. Описанные работы демонстрируют, что изменение определенного баланса в уровне активности или экспрессии коллагеназ может иметь определенное значение в механизмах созревания и деструкции коллагенового матрикса, в т.ч. и при изменении параметров механического поля.

**МЕХАНИЧЕСКАЯ И ГРАВИТАЦИОННАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК КОСТНОЙ ТКАНИ: ВЛИЯНИЕ НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК**

Особое внимание привлекают работы, посвященные изучению различных показателей состояния коллагенового биосинтеза у т.н. механоцитов (прежде всего фибробластов и костных клеток) в условиях повышенного или пониженного значения силы тяжести. Гипергравитация, как правило, приводила к усилению биосинтеза коллагена I типа [54], тогда как в условиях микрогравитации или ее моделирования его экспрессия угнеталась [4, 55]. В нашей работе было обнаружено, что в ходе коммитирования ММСК к остеогенезу, инициированного одновременно с переносом клеток в условия моделированной микрогравитации, происходит замедление выработки органического внеклеточного коллагенового матрикса (коллаген I типа) [56].

Установлена корреляция между уровнем синтеза коллагена и активацией протеинкиназ семейства MAPK, в частности ERK1/2, т.к. ингибирование этого сигнального пути приводит к частичному ухудшению уровня экспрессии и уменьшению белковой продукции одной из цепей коллагена I типа [54]. При коммитировании ММСК к остеогенезу полное отсутствие экспрессии коллагена I типа наряду с изменением в уровне экспрессии интегринов, специфич-

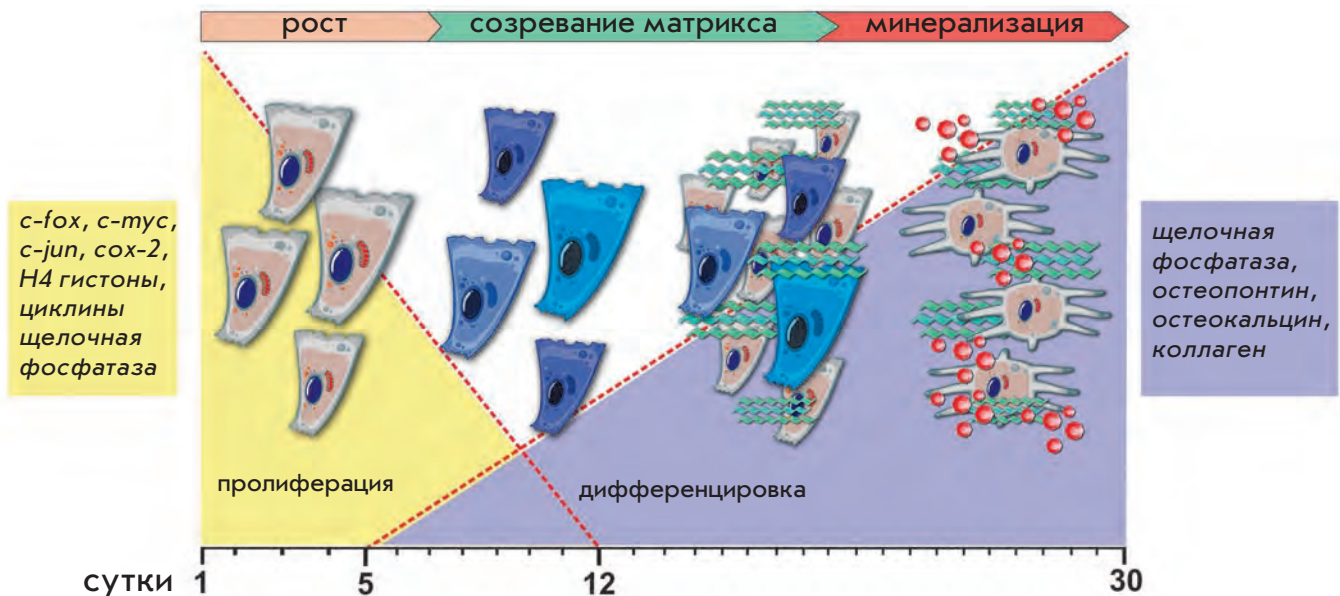


Рис. 1. Взаимоотношения между фазами роста и дифференцировки остеобластов. Ранние стадии роста остеогенных клеток регулируются генами раннего ответа *c-fos*, *c-myc*, *sox-2*, *efr-1*, а также транскрипционными факторами, которые активируются в клетках, вступивших в цикл. В течение поздних этапов пролиферативной фазы и в начальной фазе дифференцировки клеток активируются ген щелочной фосфатазы (ЩФ), коллагена и фибронектина. В середине периода созревания матрикса активируются гены белков, принимающих участие в минерализации, позднее вновь активируется ген щелочной фосфатазы [адаптировано по 5]



ных к коллагену, наблюдалось после семи суток культивирования клеток в ротационном биореакторе, и тогда же у них отмечался пониженный уровень фосфорилирования ERK1/2<sup>МАРК</sup>, тогда как уровень фосфорилирования p38<sup>МАРК</sup>, напротив, возрастал [37, 49].

Показано, что в ходе индуцированного остеогенеза нормальных клеток остеобластического фенотипа активация экспрессии коллагена I типа начинается на пятые-шестые сутки культивирования клеток в остеогенной среде, а пик экспрессии белка приходится в среднем на девятые-четырнадцатые сутки – в конце пролиферативной фазы и начале т.н. периода созревания внеклеточного матрикса (matrix maturation) [57]. Из этого следует, что кратковременные экспозиции клеток в условиях микрогравитации не обязательно должны сопровождаться ингибированием экспрессии достаточно «поздних» фенотипических генов, таких как коллаген. Вероятно, из этого может следовать и то, что экспрессия любого «механочувствительного» белкового продукта остеобластов наиболее уязвима к изменению гравитационного поля на максимуме своей экспрессии, тесно связанной у клеток остеобластического фенотипа с тремя, достаточно четко разделенными во времени, фазами дифференцировки (рис. 1).

Еще одним существенным аспектом влияния микрогравитации на процессы дифференцировки остеогенных клеток является уменьшение уровня экспрессии и активации щелочной фосфатазы, а также ингибирование экспрессии поздних маркерных белков минерализованного костного матрикса, таких как остеокальцин и остеокальцин, что свидетельствует о торможении как начальных, так и поздних этапов дифференцировки остеогенных клеток-предшественников в остеобласты [4, 36, 37, 49, 55, 58]. В костной ткани ПДФ однозначно принимает участие в минерализации костного матрикса, тем не менее до сих пор неясно, как реализуется этот механизм, а точные функции фермента остаются предметом дискуссий [59]. Далеко не всегда удается провести четкую параллель между наблюдаемыми физиологическими эффектами и уровнем активности этого фермента, что указывает на то, что могут существовать и другие пути регуляции образования минерализованного матрикса. В частности, в одной из работ было показано, что механическая стимуляция остеобластов пульсирующим потоком жидкости приводит к увеличению клеточной активности ПДФ, однако это не сопровождалось увеличением уровня минерализации матрикса в культуре [60]. Возможным объяснением может служить недавно сформулированная гипотеза о роли клеток остеогенного ряда в формировании стабильной морфологической структуры костного матрикса, в которой авторы высказывают предположение о том, что сами костные клетки в зависимости от внешних условий при помощи неколлагиновых белков костной ткани (остеоонектин, остеоонектин, остеокальцин, костный сиалопротеин) регулируют процесс образования аморфных фосфатно-кальциевых ядер минерализации, их созревание и скорость процесса кристаллизации [61]. Интересно, что пониженная экспрессия остеокальцина в условиях моделированной микрогравитации у клеток зачастую сопровождается уменьшением уровня экспрессии ключевого транскрипционного фактора, регулирующего процесс протекания остеогенной диф-

ференцировки остеогенных клеток – Runx2 (runt-related transcription factor 2), который может представлять собой одну из первичных «мишеней» влияния микрогравитации на остеобластический фенотип.

### **УЧАСТИЕ Runx2 В РЕГУЛЯЦИИ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ММСК И ОСТЕОБЛАСТОВ, ЕГО ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВНОЙ «МИШЕНИ» ИЗМЕНЕННОЙ ГРАВИТАЦИИ**

Runx2/PEBP2aA/Cbfa1, как главный регулятор остеогенной дифференцировки клеток мезенхимного происхождения, реагирующий на действие остеогенных факторов роста, впервые был идентифицирован при изучении остеогенной дифференцировки плюрипотентных мезенхимальных клеток-предшественников мыши линии C2C12 [62]. Для полноценного преобразования клеток в остеобласты и экспрессии специфических остеогенных генов необходима кооперация Runx2 и молекул Smad, активируемых BMP-2. Параллельно было обнаружено, что фактор роста BMP-7 индуцирует экспрессию мРНК Runx2 раньше, чем экспрессию остеокальцина, кроме того, трансфекция изоформой Runx2 приводит к остеогенной дифференцировке не-osteогенных клеток [63].

В настоящее время принято считать, что Runx2 является необходимым, но не единственно достаточным фактором транскрипции остеогенеза, однако в постнатальном развитии остеобластов он в совокупности с некоторыми другими транскрипционными факторами (Osx, Msx, Smad, Dlx) играет ключевую роль в регуляции процессов остеогенной дифференцировки мезенхимных клеток [64, 65]. Преостеобласты, подвергнутые механической деформации, отвечают быстрой активацией экспрессии BMP-2, Runx2 и Smad5, и лишь позднее этот эффект сопровождается возрастанием экспрессии генов, необходимых для образования и созревания матрикса ALP, COL1a1 и OC, OPN [66]. В условиях моделированной микрогравитации идентифицированы «механочувствительные гены» остеобластов, среди которых присутствует и Runx2 [67]. Кроме того, показано, что механическая низкодозовая высокочастотная ежедневная стимуляция (LMHF) преостеобластов способна предотвращать подавление остеогенного дифференцировочного потенциала клеток при моделировании микрогравитации, что сопровождается восстановлением ранее подавленной экспрессии Runx2 [68]. Интересно, что на моделях *in vivo* также было обнаружено, что снижение уровня экспрессии или инактивация Runx2 является одним из главных механизмов влияния гипоксии на остеобластический фенотип. В частности, у частично нокаутных мышей, гетерозиготных по гену Runx2, вывешивание (unloading) провоцировало более выраженную потерю массы костной ткани по сравнению с мышами дикого типа, имеющими нормальный уровень экспрессии Runx2 [69].

### **РОЛЬ МЕХАНИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ В ВЫБОРЕ ПУТИ КОММИТИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ: PPARγ2 versus Runx2**

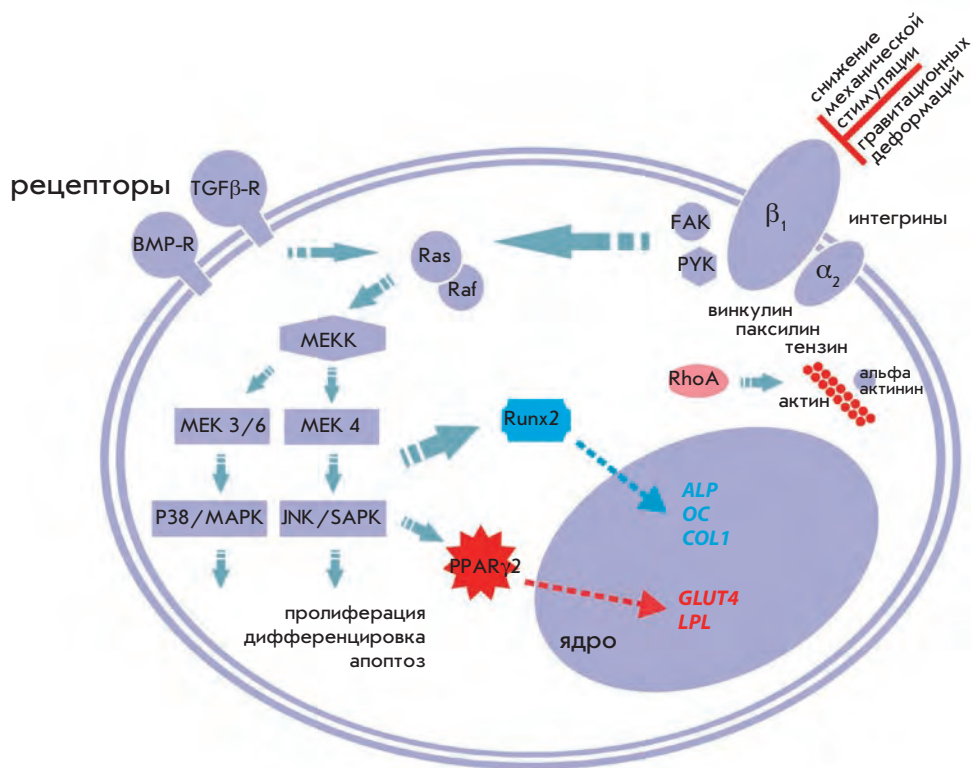
В организме существует удивительная взаимосвязь между остеогенезом и адипогенезом, которая сохраняется и при культивировании клеток-предшественников. Вероятно, столь необычные реципрокные взаимоотношения

между двумя линиями дифференцировки ММСК обусловлены существованием общих сигнальных путей и уровней регуляции, которые определяют приоритет в развитии одного направления в ущерб другому, исходя из поступающих к клеткам сигналов. По крайней мере, некоторые из этих механизмов в настоящее время распознаны.

Ключевым транскрипционным фактором адипогенеза является PPAR $\gamma$ 2, который функционирует как доминантный негативный регулятор остеогенеза [70]. Специфическая активация PPAR $\gamma$ 2 различными естественными и синтетическими лигандами ведет к полной супрессии основных транскрипционных факторов остеогенеза – *cbfa1/Runx2* и *Osterix*, а также увеличению конверсии бипотентных мезенхимальных предшественников в адипоциты, не влияя на морфофункциональное состояние остеобластов на терминальных стадиях их дифференцировки [71]. Хроническое введение агониста PPAR $\gamma$ 2 – росиглитазона приводит к потере массы костной ткани у мышей, что сопровождается возрастанием количества адипоцитов в полости костного мозга и уменьшением соотношения числа остеобластов и остеокластов [72, 73]. Интересно, что с возрастом активность PPAR $\gamma$ 2 у ММСК возрастает, что коррелирует с утратой пула остеобластов и увеличением числа адипоцитов в костном мозге. При этом у клеток уменьшается уровень экспрессии *Runx2* и *Dlx5*, а также *коллагена* и *остеокальцина* [74].

Последнее время активно обсуждается роль механических сигналов в выборе пути коммитирования и реализации многочисленных программ дифференцировки ММСК

[75]. Установлено, что механическое растяжение приводит к уменьшению содержания PPAR $\gamma$ 2 в культуре бычьих ММСК и клеток линии СЗН10Т1/2 [76]. Показано, что механические стимулы приводят к увеличению уровня экспрессии *Msx2*, активирующего остеогенную дифференцировку клеток, проявляющего синергизм с BMP-2 и действующего как супрессор адипогенеза, что выражается в ингибировании PPAR $\gamma$ 2 [77]. Транзиторная активация сигнального пути Wnt/ $\beta$ -Catenin ингибирует адипогенную дифференцировку клеток путем подавления экспрессии *C/EBP $\alpha$*  и PPAR $\gamma$ 2 и активации экспрессии факторов транскрипции остеогенеза – *Runx2*, *Dlx5*, *Osterix* [78]. Доказана возможность вовлеченности Wnt/ $\beta$ -Catenin-сигнализаии в ингибирование адипогенеза и стимуляцию остеогенеза клеток в ответ на механическую деформацию, причем показано, что этот процесс реализуется за счет  $\alpha$ -рецепторов эстрогена [79] и несмотря на культивирование клеток в среде с сильными адипогенными индукторами [80]. Интересно, что у остеобластов мыши при моделировании эффектов микрогравитации было обнаружено угнетение уровня экспрессии таких компонентов Wnt/ $\beta$ -Catenin-сигнального пути, как *Sfrp2* и *Wisp2*, что может косвенно указывать на активацию программы адипогенеза в условиях микрогравитации [67]. Также показано, что у ММСК, выделенных из костного мозга вывешенных крыс, и культивируемых *ex vivo*, происходит снижение уровня экспрессии *cbfa1/Runx2* при индукции остеогенной дифференцировки, а при индукции адипогенной дифференцировки эти клетки демонстрируют повышенную экспрессию PPAR $\gamma$ 2 и луч-



**Рис. 2.** Молекулярная регуляция пролиферации и дифференцировки ММСК в зависимости от требований «внешнего механического поля». Внеклеточные сигналы и механические стимулы или их отсутствие реализуют свое действие через соответствующие рецепторы, каналы на поверхности клетки (например, интегрины) и через другие, связанные с поверхностью клетки неизвестные механизмы. Сигналы, идущие от интегринов, поступают к связанным с ними киназам фокальной адгезии (FAK и PYK2), от которых сигналы могут поступать как к митоген-активируемому протеинкиназам (MAPK), регулирующим баланс между важнейшими внутриклеточными процессами, такими как пролиферация, дифференцировка и апоптоз, так и к эффекторным белкам цитоскелета (паксиллину, талину, винкулину) и Rho-киназам, которые осуществляют реорганизацию структуры цитоскелета клетки. Сигналы, идущие в ядро от Runx2, указаны синим цветом, от PPAR $\gamma$  – оранжевым

ше дифференцируются в адипогенном направлении [81]. Похожие изменения наблюдаются при кратковременной экспозиции ММСК в условиях моделирования эффектов микрогравитации в ротационном биореакторе [37]. Однако в ходе изучения индуцированной адипогенной дифференцировки ММСК в условиях длительного моделирования эффектов микрогравитации не было обнаружено фенотипических признаков возрастания эффективности адипогенеза ММСК [56].

Микрогравитация может модифицировать дифференцировочный потенциал клеток-предшественников вследствие изменений в деятельности основных киназных каскадов сигнальной трансдукции (рис. 2). Установлено, что MAP-киназы играют важную, если не ключевую, роль в регуляции дифференцировочного потенциала клеток мезенхимного происхождения, в т.ч. и в условиях механического стресса [41, 82, 83]. В частности, известно, что MAP-киназы осуществляют фосфорилирование Runx2, необходимое для его транскрипционной активности [84]. В то же время уменьшение/модуляция активности MAP-киназ является достаточно часто наблюдаемой реакцией клеток на моделирование микрогравитации. Показано снижение уровня фосфорилирования ERK1/2<sup>MAPK</sup> в процессе остеогенной дифференцировки ММСК в ротационном биореакторе [37, 38] или уменьшение фосфорилирования p38<sup>MAPK</sup> в процессе остеогенной дифференцировки остеобластов на 3D-клиностае [58].

#### **РОЛЬ АУТОКРИННЫХ СИГНАЛОВ В РЕГУЛЯЦИИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ И ВЫБОРЕ ПУТИ КОММИТИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОЙ ГРАВИТАЦИИ**

Взаимоисключающее влияние двух направлений коммитирования ММСК может быть связано с наличием и других регуляторных механизмов, в т.ч. аутокринного и паракринного характера. Например, продукты одного из направлений дифференцировки могут ингибировать выработку веществ, необходимых для развития другого фенотипа. Показано, что вырабатываемая адипоцитами липопротеиновая липаза может связывать сортилин, экспрессия которого индуцируется в процессе остеогенной дифференцировки ММСК, т.к. этот рецепторный белок необходим для нормальной минерализации костного матрикса, при этом сам сортилин может опосредовать эндоцитоз липопротеиновой липазы [85]. Кроме того, установлено, что возрастание адипогенной дифференцировки ММСК, полученных от пациентов, больных остеопорозом, обусловлено аномальным ответом клеток на действие цитокина лептина, который в норме действует как инактиватор PPAR $\gamma$  за счет его фосфорилирования [86].

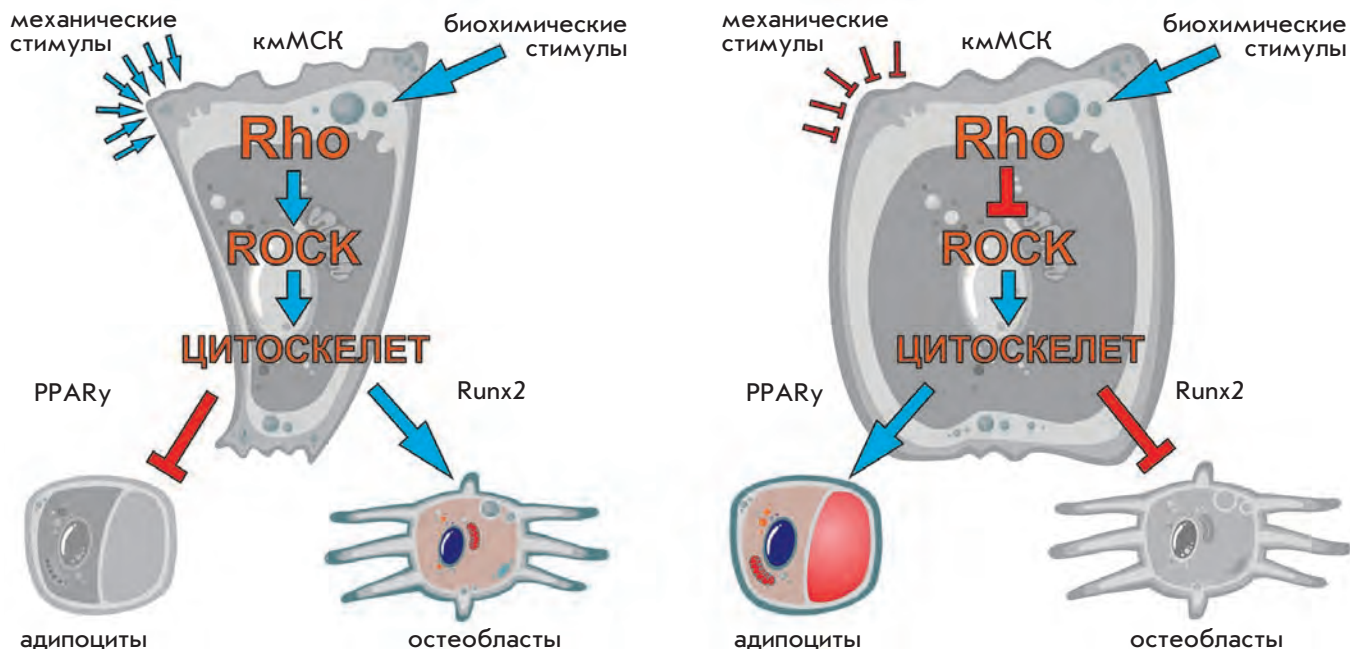
Функциональная роль большинства цитокинов в регуляции жизнедеятельности ММСК, а также адаптации этих и других остеогенных клеток к условиям микрогравитации изучена лишь в малой степени и требует дальнейших исследований. В последнее время особое внимание исследователей обращено на ИЛ-8. Известно, что экспрессия этого нейтрофил-активирующего фактора регулируется ИЛ-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , а также глюкокортикоидными гормонами. Важно отметить, что ИЛ-8 регулирует экспрессию молекул

клеточной адгезии, а также выброс некоторых ферментов, деградирующих внеклеточный матрикс [87]. Перечисленные свойства ИЛ-8 могут иметь определенное значение в локальных механизмах ремоделирования костной ткани, с помощью которых реализуются некоторые местные клеточные реакции в условиях микрогравитации. Так, в биоптатах костей обезьян *Macaca mulatta*, экспонированных на биоспутнике «Бион-11», была выявлена активация резорбтивных процессов за счет остеокластической резорбции, остеолитического остеолитизиса, а также активности нейтрофилов, которые выделяют гидролитические ферменты, включаясь в процесс деструкции минерализованного костного матрикса [88]. Недавно было продемонстрировано, что продукция ИЛ-8 у ММСК возрастает в результате реакции на циклическое механическое растяжение, при этом клетки, культивируемые в остеогенной среде, показывают максимально выраженное повышение продукции ИЛ-8 [89]. Интересно, что многократная активация продукции ИЛ-6 и ИЛ-8 наблюдалась у эндотелиальных клеток в условиях моделирования эффектов микрогравитации с помощью RPM [90]. Показано, что клетки различного уровня коммитированности (ММСК и производные от них остеогенные клетки, а также остеобласты) обладают однотипным характером аутокринных реакций на длительное пребывание в условиях моделирования эффектов микрогравитации, которые выражаются в возрастании продукции ИЛ-8 [91].

#### **РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТА В РЕАЛИЗАЦИИ ГРАВИТАЦИОННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ММСК В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОЙ ГРАВИТАЦИИ**

В последнее время появляется все больше аргументов в пользу того, что в регуляции дифференцировочного потенциала стволовых клеток в зависимости от требований «внешнего механического поля» огромную роль играют структуры цитоскелета клетки, тесно взаимосвязанные с ее поверхностными рецепторами (рис. 3). В то же время изменение формы клеток и внутриклеточной архитектоники цитоскелета является достаточно часто наблюдаемым феноменом у клеток в условиях реальной микрогравитации [22], а также при ее моделировании [26, 46, 92]. Установлено, что изменение морфологических характеристик клеток или модуляция активности семейства Rho-киназ (ГТФ-аз, связанных с актиновым цитоскелетом) приводит к модификации дифференцировочных потенциалов ММСК. В частности, активация Rho-киназы вышестоящей киназой RhoA даже в присутствии инсулиноподобного фактора роста IGF-I способствует активации миогенной дифференцировки ММСК и ингибированию адипогенной [93]. Было высказано предположение, что форма клеток выступает в виде механического стимула и играет существенную роль в выборе пути дифференцировки клеток-предшественников. Показано, что хорошо распластанные клетки лучше дифференцируются в остеогенном направлении, а круглые нераспластанные клетки – в адипогенном, при этом экспрессия доминантно негативной *RhoA* приводит к адипоцитарному пути, а сверхэкспрессия последней, напротив, способствует остеогенному. Авторы полагают, что нормальное актин-миозиновое напряжение необходимо для правильного функционирования Rho-киназ, а также что цитоскелет и связанные с ним регуляторные белки





**Рис. 3.** Модель влияния механических стимулов на выбор пути коммитирования ММСК. Форма клетки выступает в качестве механического стимула, направляя коммитирование ММСК в адипогенном и остеогенном направлении. Распластанные клетки предпочитают дифференцироваться в остеогенном направлении, а нераспластанные более круглые – в адипогенном. При изменении формы клеток активной RhoA достаточно для того, чтобы заменять биохимические стимулы, тогда как эффектор RhoA – ROCK действует независимо от формы клеток. Взаимодействие между формой клеток (механическими сигналами), RhoA-сигнализацией, активностью киназы ROCK и структурой цитоскелета изменяет направление коммитирования ММСК. Блокирование дифференцировки указано красными блокирующими сигналами, активация – синими стрелками

выполняют интегральную функцию регуляции процессов дифференцировки клеток, которые в первую очередь опосредованы механическими сигналами [94]. Интересно, что при культивировании ММСК в условиях моделированной микрогравитации у клеток развиваются изменения актинового цитоскелета, вплоть до полного отсутствия пула фибриллярного актина в клетках после семи суток экспозиции, и значительно снижается активность RhoA-киназы. При этом трансфекция клеток вирусным вектором, конститутивно экспрессирующим *RhoA*, предотвращает описанные изменения цитоскелета и нивелирует развитие адипогенных признаков в клетках [92]. Прямая связь ERK1/2<sup>МАРК</sup> с интегрин-опосредованной сигнализацией и активностью некоторых эффекторных белков цитоскелета была продемонстрирована при выключении одного из компонентов, контролирующих процесс ремоделирования актинового цитоскелета (Rho), что приводит к инактивации MAP-киназного каскада [95].

Изучение всей совокупности факторов, задействованных в выборе пути дифференцировки ММСК, поможет выявить механизмы, которые необходимы для поддержания тонкого баланса между двумя направлениями дифференцировки стволовых клеток, возможное нарушение которого в условиях гипокинезии или микрогравитации

может приводить к таким тяжелым клиническим проявлениям, как остеопения или остеопороз. В заключение следует еще раз отметить, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека, принадлежащие к компартменту низко коммитированных клеток-предшественников взрослого организма, представляют собой клеточную популяцию, которая восприимчива к изменению гравитации. Несмотря на растущее число публикаций о влиянии микрогравитации или моделирования ее эффектов на морфофункциональные характеристики различных типов культивируемых остеогенных клеток, точные молекулярные и внутриклеточные механизмы наблюдаемых эффектов до сих пор остаются не до конца ясными. Вместе с тем феноменология реакций остеогенных клеток различного уровня коммитированности указывает на существование единых механизмов восприятия и ответной реакции клеток на измененное гравитационное поле. Дальнейшие комплексные исследования в этом направлении позволят расширить фундаментальные представления о механизмах гравитационной и механической чувствительности клеток-предшественников взрослого организма и их возможной вовлеченности в развитие локальных клеточных реакций, развивающихся в костной системе в условиях микрогравитации. ●



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григорьев А.И., Егоров А.Д. Длительные космические полеты. // Космическая биология и медицина. Человек в космическом полете. М.: Наука, 1994. Т. 3. Кн. 2. 549 с.
2. Оганов В.С. Костная система, невесомость и остеопороз. // М.: Слово, 2003. 260 с.
3. Akiyama H., Kanai S., Hirano M. et al. Expression of PDGF-beta receptor, EGF receptor, and receptor adaptor protein Shc in rat osteoblasts during spaceflight // *Mol. Cell Biochem.* 1999. Vol. 202. № 1-2. P. 63-71.
4. Carmeliet G., Nys G., Bouillon R. Microgravity reduces the differentiation of human osteoblastic MG-63 cells // *J. Bone Miner. Res.* 1997. Vol. 12. № 5. P. 786-794.
5. Hughes-Fulford M. Physiological effects of microgravity on osteoblast morphology and cell biology // *Cell biology and biotechnology in space* Ed. by A. Cogoli. *Advances in space biology and medicine*, 2002. Vol. 8. P. 129-57.
6. Hughes-Fulford M., Rodenacker K., Jütting U. Reduction of anabolic signals and alteration of osteoblast nuclear morphology in microgravity // *J. Cell. Biochem.* 2006. Vol. 99. № 2. P. 435-449.
7. Kumei Y., Morita S., Katano H. et al. Microgravity signal ensnarls cell adhesion, cytoskeleton, and matrix proteins of rat osteoblasts: osteopontin, CD44, osteonectin, and alpha-tubulin // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006. Vol. 1090. P. 311-317.
8. Kumei Y., Shimokawa H., Ohya K. et al. Small GTPase Ras and Rho expression in rat osteoblasts during spaceflight // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007. Vol. 1095. P. 292-299.
9. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications // *Stem Cells.* 2001. Vol. 19. № 3. P. 180-192.
10. Crisan M., Yap S., Castella L. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs // *Cell Stem Cell.* 2008. Vol. 3. № 3. P. 301-313.
11. Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyaner D. et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells // *J. Biomed. Sci.* 2003. Vol. 10. № 2. P. 228-241.
12. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science.* 1999. Vol. 284. № 5411. P. 143-147.
13. Wagner W., Roderburg C., Wein F. et al. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors // *Stem Cells.* 2007. Vol. 25. № 10. P. 2638-2647.
14. Burger E.H., Klein-Nulend J. Microgravity and bone cell mechanosensitivity // *Bone.* 1998. Vol. 22. № 5 (Suppl). P. 127S-130S.
15. Mikuni-Takagaki Y., Suzuki Y., Kawase T., Saito S. Distinct responses of different populations of bone cells to mechanical stress // *Endocrinology.* 1996. Vol. 137. № 5. P. 2028-2035.
16. Парфенов Г.П. Невесомость и элементарные биологические процессы // *Проблемы космической биологии / Под ред. акад. А.М. Уголева. Л.: Наука, 1988. Т. 57. С. 66-77.*
17. Тайрбеков М.Г. Вероятные механизмы гравитационной чувствительности клеток // *Доклады академии наук.* 2000. Т. 375. № 1. С. 121-124.
18. Lambert C.A., Lapiere C.M., Nusgens B.V. Biology of adherent cells in microgravity // *The gravity environment in space flight. Biology in Space and life on Earth. Effects of spaceflight on biological systems.* Ed. by E. Brinckmann. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2007. P. 123-155.
19. Moore D., Cogoli A. Gravitational and space biology at the cellular level // *Biological and medical research in space. An overview of life sciences research in microgravity* Ed. by D. Moore, A. Cogoli, H. Oser. Hamburg: Springer, 1996. P. 1-107.
20. Van Loon J.J.W.A. The gravity environment in space flight // *Biology in Space and life on Earth. Effects of spaceflight on biological systems.* Ed. by E. Brinckmann. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2007. P. 17-32.
21. Буравкова Л.Б. Проблемы гравитационной биологии клетки // *Авиакосмическая и экологическая медицина.* 2008. Т. 42. № 6. С. 10-18.
22. Lewis M. The cytoskeleton, apoptosis and gene expression in T-lymphocytes and other mammalian cells exposed to altered gravity // *Cell biology and biotechnology in space* Ed. by A. Cogoli. *Advances in space biology and medicine*, 2002. Vol. 8. P. 77-128.
23. Ingber D.E. Mechanosensation through integrins: cells act locally but think globally // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003. Vol. 100. № 4. P. 147-1474.
24. Ingber D.E. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology // *J. Cell Sci.* 2003. Vol. 116. Pt 7. P.1157-1173.
25. Albrecht-Buehler G. Possible mechanisms of indirect gravity sensing by cells // *ASGSB Bull.* 1991. Vol. 4. № 2. P. 25-34.
26. Wang Y., McNamara L.M., Schaffler M.B., Weinbaum S. A model for the role of integrins in flow induced mechanotransduction in osteocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2007. Vol. 104. № 40. P. 15941-15946.
27. Ajubi N.E., Klein-Nulend J., Alblas M.J. et al. Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes // *Am. J. Physiol.* 1999. Vol. 276. № 1. P. E171-E178.
28. Pitsillides A.A., Rawlinson S.C., Suswillo R.F. et al. Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling? // *FASEB J.* 1995. Vol. 9. № 15. P. 1614-1622.
29. McGarry J.G., Klein-Nulend J., Mullender M.G., Prendergast P.J. A comparison of strain and fluid shear stress in stimulating bone cell responses - a computational and experimental study // *FASEB J.* 2005. Vol. 19. № 3. P. 482-484.
30. Smalt R., Mitchell F.T., Howard R.L., Chambers T.J. Induction of NO and prostaglandin E in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1997. № 273. P. 751-758.
31. Searby N.D., Steele C.R., Globus R.K. Influence of increased mechanical loading by hypergravity on the microtubule cytoskeleton and prostaglandin E2 release in primary osteoblasts // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005. Vol. 289. № 1. C148-158.
32. Arikawa T., Omura K., Morita I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells // *J. Cell Physiol.* 2004. Vol. 200. № 3. P. 400-406.
33. Kurpinski K., Chu J., Hashi C., Li S. Anisotropic mechanosensing by mesenchymal stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2006. Vol. 103. № 44. P. 16095-16100.
34. Rucci N., Migliaccio S., Zani B.M. et al. Characterization of the osteoblast-like cell phenotype under microgravity conditions in the NASA-approved Rotating Wall Vessel bioreactor (RWV) // *J. Cell. Biochem.* 2002. Vol. 85. № 1. P. 167-179.
35. Sato A., Hamazaki T., Oomura T. et al. Effects of microgravity on c-fos gene expression in osteoblast-like MC3T3-E1 cells // *Adv. Space Res.* 1999. Vol. 24. № 6. P. 807-813.
36. Pardo S.J., Patel M.J., Sykes M.C. et al. Simulated microgravity using the Random Positioning Machine inhibits differentiation and alters gene expression profiles of 2T3 preosteoblasts // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005. Vol. 288. № 6. P. C1211-1221.
37. Zayzafoon M., Gathings W.E., McDonald J.M. Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis // *Endocrinology.* 2004. Vol. 145. № 5. P. 2421-2432.
38. Dai Z.Q., Wang R., Ling S.K. et al. Simulated microgravity inhibits the proliferation and osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells // *Cell Prolif.* 2007. Vol. 40. № 5. P. 671-684.
39. Yuge L., Kajiume T., Tahara H. et al. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation // *Stem Cells Dev.* 2006. Vol. 15. № 6. P. 921-929.
40. Boonstra J. Growth factor-induced signal transduction in adherent mammalian cells is sensitive to gravity // *FASEB J.* 1999. Vol. 13. (Suppl). P. S35-42.
41. Jaiswal R.K., Jaiswal N., Bruder S.P. et al. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. № 13. P. 9645-9652.
42. Celil A.B., Campbell P.G. BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Ox) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. № 36. P. 31353-31359.
43. Riddle R.C., Taylor A.F., Genetos D.C., Donahue H.J. MAP kinase and calcium signaling mediate fluid flow-induced human mesenchymal stem cell proliferation // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006. Vol. 290. № 3. P. C776-784.
44. Conget P.A., Minguell J.J. Phenotypal and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells // *J. Cell. Physiol.* 1999. Vol. 181. № 1. P. 67-73.
45. Buravkova L.B., Merzlikina N.V., Romanov Y.A. Buravkov S.V. Influence of long-term gravity vector changes on human mesenchymal stem cells in vitro // *J. Grav. Physiol.* 2005. Vol. 12. № 1. P. 241-242.
46. Гершович П.М., Гершович Ю.Г., Буравкова Л.Б. Цитоскелет и адгезия культивируемых стромальных клеток-предшественников костного мозга человека при моделировании эффектов микрогравитации. *Цитология.* 2009. Т. 51. № 11. С. 896-903.
47. Miyamoto S., Teramoto H., Coso O.A. et al. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules // *J. Cell Biol.* 1995. Vol. 131. № 3. P. 791-805.
48. Iwaniec U.T., Wronski T.J., Amblard D. et al. Effects of disrupted beta1-integrin function on the skeletal response to short-term hindlimb unloading in mice // *J. Appl. Physiol.* 2005. Vol. 98. № 2. P. 690-696.
49. Meyers V.E., Zayzafoon M., Gonda S.R. et al. Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells // *J. Cell Biochem.* 2004. Vol. 93. № 4. P. 697-707.
50. You J., Reilly G.C., Zhen X. et al. Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. № 16. P. 13365-13371.
51. Ishijima M., Tsuji K., Ritling S.R. et al. Osteopontin is required for mechanical stress-dependent signals to bone marrow cells // *J. Endocrinol.* 2007. Vol. 193. № 2. P. 235-243.
52. Ohno S., Im H.J., Knudson C.B., Knudson W. Hyaluronan oligosaccharides induce matrix metalloproteinase 13 via transcriptional activation of NFkappaB and p38 MAP kinase in articular chondrocytes // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. № 26. P. 17952-17960.
53. Kasper G., Glaeser J.D., Geissler S. et al. Matrix metalloproteinase activity is an essential link between mechanical stimulus and mesenchymal stem cell behavior // *Stem Cells.* 2007. Vol. 25. № 8. P. 1985-1994.
54. Gebken J., Lüders B., Notbohm H. et al. Hypergravity stimulates collagen synthesis in human osteoblast-like cells: evidence for the involvement of p44/42 MAP-kinases (ERK 1/2) // *J. Biochem.* 1999. Vol. 126. № 4. P. 676-682.
55. Narayanan R., Smith C.L., Weigel N.L. Vector-averaged gravity-induced changes in cell signaling and vitamin D receptor activity in MG-63 cells are reversed by a 1,25-(OH)2D3 analog, EB1089 // *Bone.* 2002. Vol. 31. № 3. P. 381-388.
56. Гершович Ю.Г., Гершович П.М., Буравкова Л.Б. Влияние клинотатирования на культивируемые мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека // *Технологии живых систем.* 2009. № 2. С. 3-9.
57. Stein G.S., Lian J.B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype // *Endocr. Rev.* 1993. Vol. 14. № 4. P. 424-442.
58. Yuge L., Hide I., Kumagai T. et al. Cell differentiation and p38(MAPK) cascade are inhibited in human osteoblasts cultured in a three-dimensional clinostat // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2003. Vol. 39. № 1-2. P. 89-97.
59. Sugawara Y., Suzuki K., Koshikawa M. et al. Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells // *Jpn. J. Pharmacol.* 2002. Vol. 88. № 3. P. 262-269.
60. Nauman E.A., Satcher R.L., Keaveny T.M. et al. Osteoblasts respond to pulsatile fluid flow with short-term increases in PGE(2) but no change in mineralization //

- J. Appl Physiol. 2001. Vol. 90. № 5. P. 1849–1854.
61. Аврунин А.С., Корнилов Н.В., Марин Ю.Б. Гипотеза о роли клеток остеогенного ряда в формировании стабильной морфологической структуры минералов костного матрикса // *Морфология*. 2002. Т. 122. № 6. С. 74–77.
  62. Lee K-S, Kim H-J, Li Q-L et al. Runx2 is a common target of transforming growth factor  $\beta$ 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between runx2 and smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12 // *Mol. and Cell. Biol.* 2000. Vol. 20. № 23. P. 8783–8792.
  63. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance // *Science*. 2000. Vol. 289. № 5484. P. 1501–1504.
  64. Lee M-H, Kim Y-H, Kim H-J et al. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. № 36. P. 34387–34394.
  65. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1 // *Endocr. Rev.* 2000. Vol. 21. № 4. P. 393–411.
  66. Rath B, Nam J, Knobloch T.J et al. Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts // *J. Biomech.* 2008. Vol. 41. № 5. P. 1095–1103.
  67. Capulli M, Rufo A, Teti A, and Rucci N. Global transcriptome analysis in mouse calvarial osteoblasts highlights sets of genes regulated by modeled microgravity and identifies a “Mechanoresponsive osteoblast gene signature” // *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009. Vol. 10. P. 240–252.
  68. Patel M.J., Chang K.H., Sykes M.C. et al. Low magnitude and high frequency mechanical loading prevents decreased bone formation responses of 2T3 preosteoblasts // *J. Cell Biochem.* 2009. Vol. 106. № 2. P. 306–316.
  69. Salingarnboriboon R, Tsuji K, Komori T et al. Runx2 is a target of mechanical unloading to alter osteoblastic activity and bone formation in vivo // *Endocrinology*. 2006. Vol. 147. № 5. P. 2296–2305.
  70. Shockley K.R., Rosen C.J., Churchill G.A., Lecka-Czernik B. PPAR $\gamma$ 2 regulates a molecular signature of marrow mesenchymal stem cells // *PPAR Res.* 2007. Vol. 2007. P. 81219.
  71. Lecka-Czernik B, Moerman E.J., Grant D.F. et al. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation // *Endocrinology*. 2002. Vol. 143. № 6. P. 2376–2384.
  72. Ali A.A., Weinstein R.S., Stewart S.A. et al. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation // *Endocrinology*. 2005. Vol. 146. № 3. P. 1226–1235.
  73. Lazarenko O.P., Rzonca S.O., Hogue W.R. et al. Rosiglitazone induces decreases in bone mass and strength that are reminiscent of aged bone // *Endocrinology*. 2007. Vol. 148. № 6. P. 2669–2680.
  74. Moerman E.J., Teng K., Lipschitz D.A., Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR- $\gamma$ 2 transcription factor and TGF- $\beta$ /BMP signaling pathways // *Aging Cell*. 2004. Vol. 3. № 6. P. 379–389.
  75. Estes B.T., Gimble J.M., Guilak F. Mechanical signals as regulators of stem cell fate // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2004. № 60. P. 91–126.
  76. David V., Martin A., Lafage-Proust M.H. et al. Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis // *Endocrinology*. 2007. Vol. 148. № 5. P. 2553–2562.
  77. Cheng S.L., Shao J.S., Charlton-Kachigian N. et al. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. № 46. P. 45969–45977.
  78. Kang S., Bennett C.N., Gerin I. et al. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. № 19. P. 14515–14524.
  79. Armstrong V.J., Muzylak M., Sinters A. et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor  $\alpha$  // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. № 28. P. 20715–20727.
  80. Sen B., Xie Z., Case N. et al. Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable  $\beta$ -catenin signal // *Endocrinology*. 2008. Vol. 149. № 12. P. 6065–6075.
  81. Pan Z., Yang J., Guo C. et al. Effects of hindlimb unloading on ex vivo growth and osteogenic/adipogenic potentials of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in rats // *Stem Cells Dev.* 2008. Vol. 17. № 4. P. 795–804.
  82. Boutahar N., Guignandon A., Vico L., Lafage-Proust M.H. Mechanical strain on osteoblasts activates autophosphorylation of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 tyrosine sites involved in ERK activation // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. № 29. P. 30588–30599.
  83. Salasznyk R.M., Klees R.F., Williams W.A. et al. Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells // *Exp. Cell Res.* 2007. Vol. 313. № 1. P. 22–37.
  84. Xiao G., Jiang D., Thomas P. et al. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1 // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. № 6. P. 4453–4459.
  85. Maeda S., Nobukuni T., Shimo-Onoda K. et al. Sortilin is upregulated during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes extracellular matrix mineralization // *J. Cell Physiol.* 2002. Vol. 193. № 1. P. 73–79.
  86. Astudillo P., Ríos S., Pastenes L. et al. Increased adipogenesis of osteoporotic human-mesenchymal stem cells (MSCs) characterizes by impaired leptin action // *J. Cell Biochem.* 2008. Vol. 103. № 4. P. 1054–1065.
  87. Chaudhary L.R., Avioli L.V. Regulation of interleukin-8 gene expression by interleukin-1 $\beta$ , osteotropic hormones, and protein kinase inhibitors in normal human bone marrow stromal cells // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. № 28. P. 16591–16596.
  88. Родионова Н.В., Оганов В.С. Цитологические механизмы развития остеопороза при действии факторов космического полета // *Проблемы остеологии*. 2001. Т. 4. № 1–2. С. 135–136.
  89. Sumanasinghe R.D., Pfeiler T.W., Monteiro-Riviere N.A., Lobo E.G. Expression of proinflammatory cytokines by human mesenchymal stem cells in response to cyclic tensile strain // *J. Cell Physiol.* 2009. Vol. 219. № 1. P. 77–83.
  90. Ulbrich C., Westphal K., Baatout S. et al. Effects of basic fibroblast growth factor on endothelial cells under conditions of simulated microgravity // *J. Cell. Biochem.* 2008. Vol. 104. № 4. P. 1324–1341.
  91. Гершович Ю.Г., Буравкова Л.Б. Продукция интерлейкинов в культуре мезенхимальных стромальных клеток человека при моделировании эффектов микрогравитации. // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2009. № 3. С. 44–50.
  92. Meyers V.E., Zayzafoon M., Douglas J.T., McDonald J.M. RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity // *J. Bone Miner. Res.* 2005. Vol. 20. № 10. P. 1858–1866.
  93. Sordella R., Jiang W., Chen G.C. et al. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis // *Cell*. 2003. Vol. 113. № 2. P. 147–158.
  94. McBeath R., Pirone D.M., Nelson C.M. et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment // *Dev. Cell*. 2004. Vol. 6. № 4. P. 483–495.
  95. Renshaw M.W., Toksoz D., Schwartz M.A. Involvement of the small GTPase Rho in integrin-mediated activation of mitogen-activated protein kinase // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. № 36. P. 21691–21694.

УДК 577.113:577.151:577.152.6:577.213.32

# Селективность ферментативного превращения олигонуклеотидных зондов при анализе нуклеотидных полиморфизмов ДНК

О.А. Виноградова, Д.В. Пышный\*

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

\*E-mail: pyshnyi@niboch.nsc.ru

**РЕФЕРАТ** Анализ нуклеотидных полиморфизмов в ДНК является одной из основных задач современной ДНК-диагностики. ДНК-зависимые ферменты (ДНК-полимеразы или ДНК-лигазы) широко применяются для повышения чувствительности и надежности систем выявления точечных мутаций в генетическом материале. В данном обзоре проведена систематизация данных, связанных с изучением селективности действия ДНК-зависимых ферментов и с рассмотрением факторов структуры ферментов и ДНК-субстратов, влияющих на эффективность дискриминации мисматчей при ферментативном превращении олигонуклеотидных зондов на анализируемой ДНК-матрице. Представлены данные, характеризующие чувствительность ряда широко используемых в анализе нуклеиновых кислот ДНК-зависимых ферментов по отношению к наличию в субстратном комплексе некомплементарных пар оснований. Проанализированы особенности пространственной организации фермент-субстратных комплексов, принципиально необходимые для эффективного протекания ферментативной реакции и распознавания совершенных ДНК-субстратов. Обсуждаются показательные способы повышения селективности фермент-зависимых реакций, основанные на использовании модифицированных олигонуклеотидных зондов, «возмущающих» нативную структуру ДНК-субстратных комплексов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ДНК-комплексы, мисматч, селективность, ДНК-лигаза, ДНК-полимераза, модифицированные олигонуклеотидные зонды.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ПЦР – полимеразная цепная реакция, НК – нуклеиновая кислота, AdD – нуклеотидилтрансферазный домен ДНК-лигаз, OB – олигонуклеотид связывающий домен ДНК-лигаз, DBD – ДНК-связывающий домен ДНК-лигаз, HhH – мотив ДНК-лигаз спираль-шпилька-спираль, Zn – цинковые пальцы, BRCT – С-концевой домен ДНК-лигаз, PNA – пептидил нуклеиновые кислоты, LNA – замкнутые нуклеиновые кислоты, ENA – этилен-содержащие замкнутые нуклеиновые кислоты, dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфат, PPi – неорганический пирофосфат, оц – основная цепь пептидного остова.

## ВВЕДЕНИЕ

Однонуклеотидные замены (SNP) представляют собой наиболее часто встречающиеся генетические вариации генома. В настоящее время общее число известных однонуклеотидных мутаций в геноме человека превышает 9 миллионов [1]. Подобные мутации часто являются важными генетическими маркерами, определяющими как фенотипические и физиологические особенности индивидуума, так и молекулярные основы заболеваний.

Обнаружение однонуклеотидных замен в нуклеиновых кислотах (НК) простыми эффективными воспроизводимыми методами представляет собой большой практический интерес. Развитие методов выявления точечных мутаций, в которых используются специфические олигонуклеотидные зонды, способные распознавать комплементарные участки НК-мишеней, привело к разработке целого ряда подходов, основанных на применении ДНК-зависимых ферментов, чаще всего ДНК-полимераз [2, 3] и/или ДНК-лигаз [4, 5]. На настоящий момент в практику прочно вошли такие

методы детекции однонуклеотидных замен, как аллель-специфичная ПЦР [2, 6], минисеквенирование [7, 8], лигирование олигонуклеотидов (OLA – Oligonucleotide Ligation Assay) [9, 10], лигазная цепная реакция (LCR – Ligase Chain Reaction) [11] и другие комбинированные подходы, например модифицированная лигазная цепная реакция (Gar-LCR) [12], основанные на одновременном использовании обоих типов ферментов. В рамках большинства методов дизайн олигонуклеотидных зондов проводят таким образом, чтобы выявляемая нуклеотидная замена в анализируемой НК-матрице была в составе гибридизационного комплекса, формируя некомплементарную пару оснований (мисматч). Таким образом, детектирование мисматча, сопряженное с дуплекс-зависимым мечением зонда, может осуществляться на двух этапах. Во-первых, на этапе гибридизации (за счет снижения стабильности несовершенного комплекса) и, во-вторых, на этапе ферментативного превращения зонда (за счет уменьшения эффективности действия ферментов, обусловленного присутствием

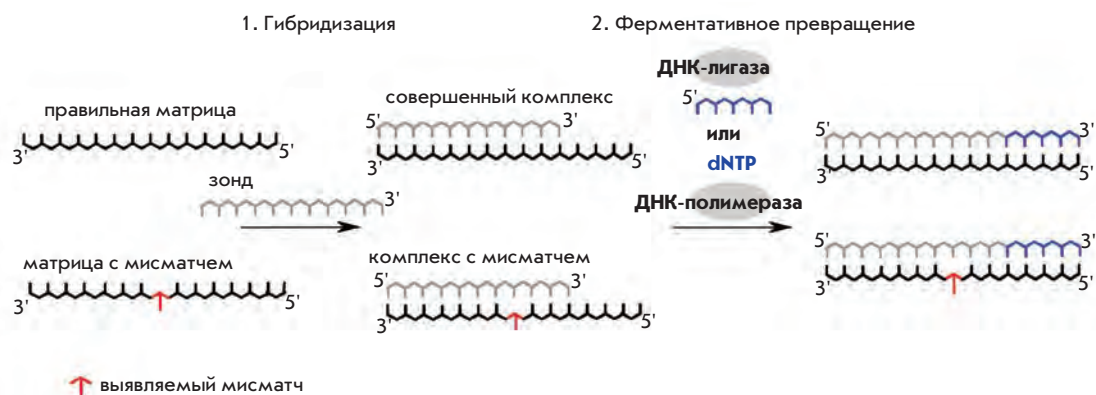


Рис. 1. Этапы гибридационного анализа ДНК с использованием олигонуклеотидных зондов и ДНК-зависимых ферментов

в ДНК-субстрате некомплементарной пары) (рис. 1). Однако в ряде случаев даже подобный двухстадийный контроль оказывается недостаточным для достоверного анализа НК. Однонуклеотидные несоответствия, нарушающие полную комплементарность ДНК-дуплекса, и в случае использования ДНК-зависимых ферментов часто не обеспечивают специфичности диагностической системы.

Поиск способов повышения достоверности анализа полиморфизмов в НК, основанных на использовании ферментов, ведется в мире уже в течение не одного десятилетия. Однако данный вопрос до сих пор сохраняет свою актуальность, поскольку предлагаемые на настоящий момент методы повышения селективности действия ДНК-зависимых ферментов часто не являются универсальными и требуют в каждом конкретном случае предварительного скрининга условий, их оптимизации в контексте решаемой задачи.

В обзоре представлены данные, характеризующие: 1) чувствительность ряда используемых в анализе нуклеиновых кислот ДНК-зависимых ферментов по отношению к наличию и типу одиночного мисматча в субстратном комплексе; 2) структурные особенности ферментов и субстратных комплексов, влияющие на селективность действия фермента. Проанализированы особенности пространственной организации фермент-субстратных комплексов, реализуемой в их составе сети белково-нуклеиновых контактов, принципиально необходимых для эффективного протекания ферментативной реакции. Рассмотрены представленные в литературе способы повышения селективности фермент-зависимых реакций, основанные на введении в структуру несовершенных ДНК-субстратов дополнительных «возмущающих» элементов: преднамеренных мисматчей и неприродных аналогов нуклеотидов.

### СЕЛЕКТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ДНК-ЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К НЕКОМПЛЕМЕНТАРНЫМ ПАРАМ В СТРУКТУРЕ ДНК-СУБСТРАТА

В представленном обзоре под селективностью ферментов будем понимать их способность в определенных условиях распознавать некомплементарную пару оснований в субстратных комплексах, т.е. снижать эффективность ферментативного превращения несовершенных комплексов по сравнению с совершенными (полностью комплементарными). Известно, что способность ферментов выявлять ту или иную некомплементарную пару в составе

ДНК-субстрата определяется ее типом, нуклеотидным окружением и расположением относительно сайта ферментативного превращения. Селективность действия ферментов зависит и от ряда внешних факторов (буферные, температурные, временные условия), поэтому при анализе литературных данных часто сложно выделить общие закономерности дискриминации ферментами одних мисматчей и толерантности к другим. Некоторые трудности анализа и сопоставления данных по эффективности выявления мисматчей обусловлены различиями в методах оценки селективности ферментов, которые используются в разных работах. Наиболее часто авторы проводят сравнение следующих характеристик: выходов продуктов ферментативной реакции; начальных скоростей накопления продукта; соотношения величин  $V_{max}/K_m$ ; рассматривают параметр разницы между величинами порогового цикла ( $\Delta C_t$  – от англ. threshold cycle) при проведении ПЦР в режиме реального времени для совершенной и несовершенной систем; или же делают выводы на основании анализа частот встречаемости мисматчей в продуктах ферментативного превращения статистической библиотеки олигонуклеотидов в составе комплексов с ДНК-матрицей известной структуры.

В общем случае значительное снижение эффективности образования целевого продукта удлинения обычного олигонуклеотидного зонда с помощью ДНК-полимераз наблюдается при наличии однонуклеотидного несоответствия исключительно на 3'-конце удлиняемой цепи [13–17] и в некоторых случаях в предпоследнем от 3'-конца положении [15, 18]. В то же время присутствие во внутренней части субстратного комплекса даже нескольких мисматчей может не отражаться на накоплении продукта. Так, в работе [19] было показано, что наличие от 2 до 4 внутренних мисматчей в составе протяженных (28–30 п.н.) комплексов олигонуклеотидов-затравок с ДНК не оказывает сколько-нибудь значительного влияния на выход продукта ПЦР с участием ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* (Taq). И лишь присутствие 5 и 6 некомплементарных пар оснований снижает эффективность реакции в 22 и 100 раз соответственно. Согласно другим данным одиночного нуклеотидного несоответствия, расположенного на большем удалении от 3'-конца (вплоть до -8 позиции), достаточно для снижения выхода продукта полимеразной реакции в 10 и более (до 1000) раз для зондов длиной 17–19 нт. [20].



**Таблица 1.** Относительная эффективность удлинения ДНК-субстратных комплексов, совершенных или содержащих 3'-концевой мисматч, под действием ДНК-полимераз



ДНК-полимераза	Соответствующий матричный нуклеотид	Праймер, 3'-концевой нуклеотид				Ссылка
		A	T	G	C	
<i>Taq</i> ДНК-полимераза	T	++++	+	++	+	[15]
	A	+	++++	+	+	
	C	+	+	++++	+	
	G	+	+	+	++++	
<i>Taq</i> ДНК-полимераза	T	++++	++++	++++	++++	[14]
	A	++	++++	+	++++	
	C	++++	++++	++++	+	
	G	+	++++	+++	++++	
<i>Taq</i> ДНК-полимераза	T	++++	+++	++++	+++	[21]
	A	++	++++	+++	+++	
	C	++++	+++	++++	+++	
	G	++	+++	+++	++++	
<i>Taq</i> ДНК-полимераза	T	++++	+	++	+++	[3]
	A	+	++++	-	++	
	C	++	+	++++	-	
	G	-	++	-	++++	
обратная транскриптаза вируса птичьего миелобластога	T	++++	++	++++	++	[23]
	A	+	++++	+	++	
	C	++	++	++++	+	
	G	+	+++	-	++++	
ДНК-полимераза <i>α Drosophila melanogaster</i>	T	++++	++	++	++	[23]
	A	+	++++	+	++	
	C	++	++	++++	+	
	G	++	++	+	++++	

Примечание. «-» означает отсутствие достоверно регистрируемого продукта ферментативного превращения олигонуклеотидного зонда. При наличии продукта реакции эффективность его образования оценена по четырехбалльной шкале от «+» до «++++». Эффективность образования продукта в случае использования комплементарной матрицы всегда принималась за «++++».

Однако подобный эффект наблюдался не для всех ДНК-матриц, рассмотренных в работе [20].

При исследовании влияния типа несоответствия, расположенного на 3'-конце удлиняемой цепи, на эффективность полимеразной реакции наблюдаются некоторые общие закономерности (табл. 1), для ДНК-полимераз из разных организмов эффективность дискриминации нуклеотидных несоответствий снижается в ряду:

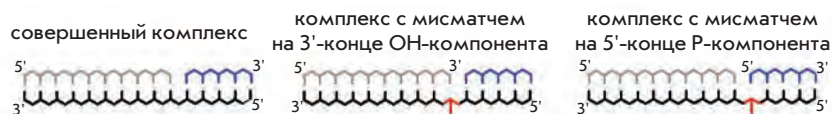
Pur/Pur > Pyr/Pyr > Pur/Pyr = Pyr/Pur [2, 3, 14, 22, 23], здесь и далее по тексту на первом месте обычным шрифтом указаны нуклеотиды цепи олигонуклеотида-затравки, на втором месте и жирным шрифтом – основания матричной цепи.

Согласно данным работы [3] рассчитанная по формуле  $(V_{\text{пак}}/K_m)_{\text{н/мисматч}} / (V_{\text{пак}}/K_m)_{\text{н/комплемент}}$  относительная эффективность удлинения *Taq* полимеразой мисматч-содержащего

ДНК-субстрата составляет менее  $10^{-6}$  для Pur/Pur мисматча,  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  для Pyr/Pyr и  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  для Pur/Pyr и Pyr/Pur. Подобные характеристики определены и для ДНК-полимеразы *α Drosophila melanogaster* и обратной транскриптазы вируса птичьего миелобластога (AMV RT) [23]. Для данных ферментов эффективность дискриминации по каждому типу несоответствий на порядок ниже. Как правило, накопление продукта, содержащего мисматч, полностью согласуется с представленной схемой, но полное ингибирование фермента и отсутствие полноразмерного продукта если и наблюдается, то только в случае пурин/пуринных несоответствий [2, 3]. Однако описаны исключения и из этой закономерности. В работах [3, 14] показано, что *Taq* ДНК-полимераза не удлиняет праймер при наличии в его 3'-концевом положении пиримидин/пиримидинового мисматча C/C, или же, напротив, эффективное удлинение праймера происходит, если в данном положении комплекса ДНК-матрица/праймер присутствует мисматч C/T [3] или любой из мисматчей, образуемый остатком T на 3'-конце праймера (T/G, T/C, T/T) [14]. Согласно другому исследованию [15] праймеры, на 3'-конце которых расположены T, G или C, не удлиняются *Taq* полимеразой в случае матриц с нуклеотидными заменами в соответствующем положении, в то время как праймер с 3'-A на фоне общего снижения эффективности ПЦР с его участием приводит к сравнительно низкой дискриминации любого из 3'-концевых мисматчей 3'-A/N.

Как и для ДНК-полимераз, важным фактором, определяющим эффективность ферментативной реакции в случае ДНК-лигаз, является положение однонуклеотидного несоответствия относительно сайта превращения. Близость мисматча к сайту лигирования двух олигонуклеотидов (одноцепочечному разрыву) повышает фактор дискриминации мисматча, оказывая наиболее существенное ингибирование фермента [13, 24, 25]. Например, для ДНК-лигаз фага T4 и бактерии *Thermus thermophilus* (*Tth*) выход ферментативной реакции в случае субстрата с мисматчем, удаленным на один нуклеотид, в 2.5–5 раз меньше относительно случая, когда мисматч в субстрате локализован непосредственно в сайте превращения [24]. При лигировании статистического набора наномеров [26] и додекамеров [27] на ДНК-матрице с помощью *Tth* ДНК-лигазы и ДНК-лигазы *E.coli*, соответственно, с последующим секвенированием полученных протяженных продуктов было показано, что наибольшее количество некомплементарных пар оснований встречается в центральной части комплексов лигируемых олигонуклеотидных блоков. Мисматчи находились преимущественно в пятой позиции от 3'-конца для нанонуклеотидов [26] и в шестой или седьмой позициях от 3'-конца при лигировании додекануклеотидов [27]. Лигирование зондов, содержащих статистические нуклеотиды в первых пяти позициях с обеих сторон от одноцепочечного разрыва, показало, что и в случае ДНК-лигазы фага T4 мисматчи практически не встречаются в первых двух позициях с любой стороны относительно ника. Больше всего несоответствий наблюдается в третьей позиции, при этом наиболее высокая вероятность встречаемости мисматча T/G [28]. Отметим, что для ДНК-лигаз, кроме удаленности мисматча от одноцепочечного разрыва, важным фактором для его дискриминации является то, в составе какого из ли-

Таблица 2. Относительная эффективность лигирования ДНК-комплексов, совершенных или содержащих мисматч на 3'-конце ОН-компонента или 5'-конце Р-компонента, с помощью ДНК-лигаз



ДНК-лигаза	Соответствующий матричный нуклеотид	ОН-компонент, 3'-нуклеотид				Р-компонент, 5'-нуклеотид				Ссылка
		A	T	G	C	A	T	G	C	
Т4 ДНК-лигаза	Т	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	[36]
	А	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	
	С	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	
	G	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	
Т4 ДНК-лигаза	Т	н/о	н/о	н/о	н/о	++++	+++	++++	+++	[37]
	А	н/о	н/о	н/о	н/о	++	++++	+	+++	
	С	н/о	н/о	н/о	н/о	++++	+++	++++	++	
	G	н/о	н/о	н/о	н/о	+	++++	+	++++	
Т4 ДНК-лигаза	Т	++++	+++	++	+++	н/о	н/о	н/о	н/о	[35]
	А	++	++++	+	+++	н/о	н/о	н/о	н/о	
	С	+++	++++	++++	++	н/о	н/о	н/о	н/о	
	G	++	++++	+++	++++	н/о	н/о	н/о	н/о	
ДНК-лигаза III человека	Т	++++	+	+	++	н/о	н/о	н/о	н/о	[33]
	А	+	++++	-	+	н/о	н/о	н/о	н/о	
	С	+	++	++++	+	н/о	н/о	н/о	н/о	
	G	-	+++	-	++++	н/о	н/о	н/о	н/о	
ДНК-лигаза <i>Chlorella virus</i>	Т	++++	+	+	++	++++	++++	++++	++++	[29]
	А	++	++++	+	++	++	++++	+	+++	
	С	+	++	++++	+	+++	+++	++++	++	
	G	+	++	+	++++	+	+++	++	++++	
Tth ДНК-лигаза	Т	++++	-	+	-	++++	++	++	-	[30]
	А	-	++++	-	-	+	++++	-	+	
	С	-	-	++++	-	++	+	++++	-	
	G	-	+	-	++++	+	+	-	++++	
ДНК-лигаза вируса АСЛ	Т	++++	+++	+++	++++	н/о	н/о	н/о	н/о	[35]
	А	++	++++	++	++++	н/о	н/о	н/о	н/о	
	С	+++	++++	++++	+++	н/о	н/о	н/о	н/о	
	G	++	+++	+++	++++	н/о	н/о	н/о	н/о	

Примечание. См. примечание к табл. 1; н/о – эффективность образования продукта не оценивалась.

гируемых компонентов он находится: в дуплексной части донора 3'-гидроксильной группы (ОН-компонента) или же донора 5'-концевого фосфата (Р-компонента). ДНК-лигазы предъявляют «повышенные» требования к структуре ОН-компонента субстратного комплекса, и любое возмущение в соответствующей части ДНК-субстрата оказывает более выраженное влияние на ферментативный процесс по сравнению с аналогичным возмущением в Р-компоненте дуплекса [26–32].

Из анализа представленных в литературе данных о влиянии типа мисматча, расположенного вблизи сайта превращения, на эффективность ферментативного лигирования ДНК-субстрата довольно сложно выделить общую закономерность для ДНК-лигаз, выделенных из разных организмов (табл. 2). Лигаза *Vaccinia virus* и *Chlorella virus*, а также ДНК-лигазы I и III человека способны эффективно дискриминировать лишь 3'-пурин/пуриновые мисматчи,

локализованные со стороны ОН-компонента [29, 30, 33, 34]. В случае ДНК-лигазы *Chlorella virus* также 5'-G/A и A/G мисматчи со стороны Р-компонента приводят к значительному снижению (в 100 раз) эффективности лигирования несовершенного субстрата относительно совершенного [29]. Большинство же однонуклеотидных несоответствий в Р-компоненте комплекса практически не дискриминируется вышеуказанными ДНК-лигазами. Наиболее плохо распознаются тимидин-содержащие мисматчи: 5'-C/T и G/T [33]. ДНК-лигаза археи, *Thermococcus kodakaraensis*, чувствительна ко всем 3'-несоответствиям в ОН-компоненте, а в случае мисматчей с участием 5'-концевого нуклеотида Р-компонента распознает только пурин/пуриновые [31]. ДНК-лигаза вируса африканской свиной лихорадки (АСЛ), по сравнению с другими изученными ДНК-лигазами, наоборот, самая нечувствительная по отношению к 3'-несоответствиям в ОН-компоненте [35]. Данная ДНК-лигаза проявля-

ет наиболее высокую точность, определенную по формуле  $(V_{\max}/K_m)_{\text{мисматч}}/(V_{\max}/K_m)_{\text{комплемент}}$  и равную  $10^{-4}$ , для субстрата с мисматчем 3'-G/A, наиболее низкую (равную 2.7) для комплекса с мисматчем 3'-T/C, превращаемым эффективнее случая совершенных субстратов. Для *Tth* ДНК-лигазы при лигировании статистического набора зондов было показано формирование в основном пурин-содержащих мисматчей (G/T, G/A, G/G, A/G), встречающихся в 86 % случаев, из них 71 % некомплементарных пар содержал остаток гуанина [26]. Кроме того, при лигировании библиотеки была отмечена неравнозначность изомисматчей G/T и T/G, встречаемость которых составила 14 и 2 раза (общее количество образуемых мисматчей 57) при расположении гуанина в составе лигируемой и матричной цепи соответственно [26]. Аналогичный эксперимент по лигированию библиотеки олигонуклеотидов с помощью ДНК-лигазы *E.coli* также выявил накопление преимущественно G/T мисматчей [27]. В то же время в ряде работ показано, что T4 ДНК-лигаза способна лигировать большинство мисматчей вне зависимости от их расположения относительно сайта ферментативного превращения [32, 36, 37]. Тем не менее согласно [35] к дискриминируемым мисматчам можно отнести 3'-концевые пурин/пуриновые несоответствия, кроме 3'-G/G, и пиримидин/пиримидиновый мисматч 3'-C/C, точность их превращения T4 ДНК-лигазой, согласно указанной выше формуле, составляет  $10^{-4}$ – $10^{-6}$ .

Литературные данные по эффективности выявления одиночных мисматчей вблизи сайта ферментативного превращения ДНК-полимеразами и ДНК-лигазами сведены в табл. 1 и 2 соответственно. Представленные данные подтверждают все отмеченные выше особенности протекания реакций с участием ДНК-зависимых ферментов в случае ДНК-субстратов с одиночным мисматчем.

Таким образом, с абсолютной уверенностью можно говорить только о том, что ДНК-полимераза и ДНК-лигаза при превращении нативных дуплексов часто не демонстрируют исключительную селективность действия, которой было бы достаточно для надежного выявления любых

нуклеотидных несоответствий в субстратном дуплексе, сформированном на основе нативных олигонуклеотидов. Следовательно, одной из первоочередных задач при разработке методов выявления точечных мутаций с помощью систем, основанных на использовании ДНК-зависимых ферментов, является систематический анализ факторов, определяющих чувствительность таких молекулярных систем к локальным нарушениям в структуре комплексов зонд/ДНК. С нашей точки зрения аспекты, связанные со строением рассматриваемых диагностически значимых ферментов, ДНК-лигаз и ДНК-полимераз, а также с особенностями пространственной организации их комплексов с субстратами, позволят определить возможные пути повышения селективности анализа ДНК и обосновать их эффективность.

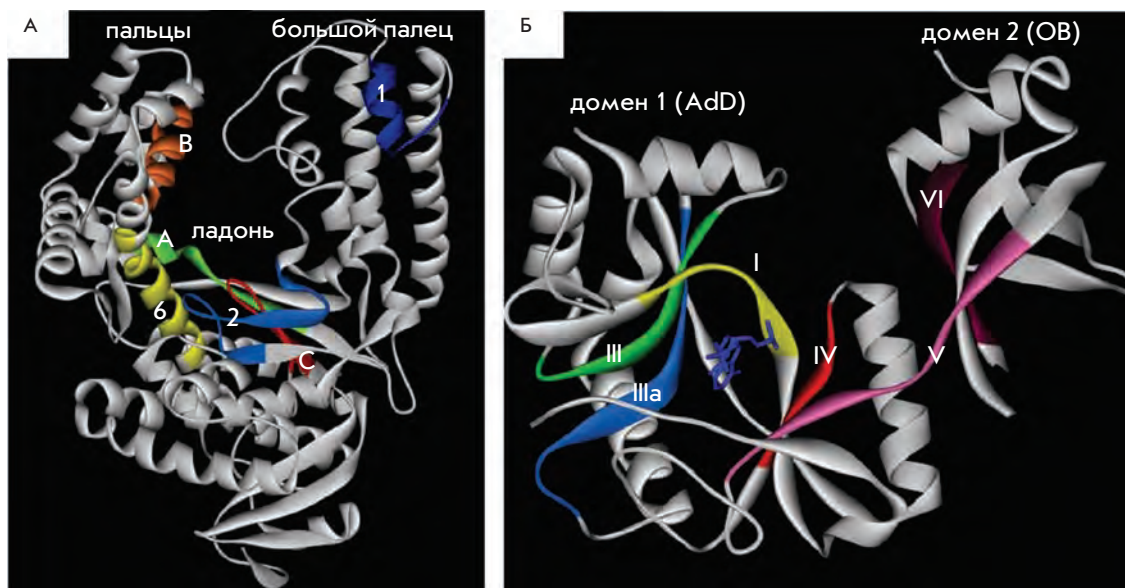
### ОСОБЕННОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ И ДНК-ЛИГАЗ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С ДНК-СУБСТРАТОМ

ДНК-полимераза и ДНК-лигаза катализируют образование новых фосфодиэфирных связей между нуклеотидными компонентами-предшественниками в составе двухцепочечных структур ДНК. Относясь к разным классам ферментов, они, тем не менее, имеют значительные сходства, как в плане наличия общих структурных элементов, так и в особенностях взаимодействия с ДНК-субстратом.

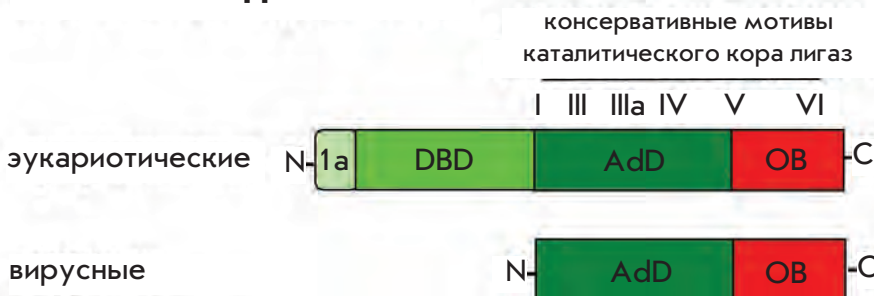
### ОБЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДОМЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ И СТРУКТУРЫ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ДНК-ЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ

Каталитический кор выделенных из разных организмов ДНК-полимераз, отличающихся по аминокислотной последовательности и относящихся к разным семействам, имеет схожую архитектуру и содержит три домена, пространственная организация которых напоминает по форме полуоткрытую кисть руки. Домены имеют соответствующие названия: «ладонь», «большой палец» и остальные «пальцы» (рис. 2, А) [38–40]. В доменах ДНК-полимераза се-

**Рис. 2.** Пространственные структуры и доменная организация *Taq* ДНК-полимеразы в свободном состоянии (А) и ДНК-лигазы *Chlorella virus* в аденилированном состоянии (Б). Отдельные мотивы выделены разными цветами. Изображения получены с использованием структур PDB 1TAQ [41] и 1FVI [54] соответственно



## АТФ-зависимые ДНК-лигазы

NAD<sup>+</sup>-зависимые ДНК-лигазы

мейства А выделяют шесть эволюционно консервативных мотивов (А, В, С, 1, 2 и 6), которым отводится основная роль в формировании активного центра и сети специфических контактов с ДНК-субстратом [39–42]. Из них наиболее консервативны мотивы А, В и С, два из которых (А и С) присутствуют во всех известных ДНК- и РНК-полимеразах. Мотивы 1, 2 и 6 обладают достаточно консервативной пространственной организацией, но в них допускаются большие вариации аминокислотных последовательностей. Данные домены, по сравнению с высококонсервативными А, В и С, в меньшей степени вовлечены в формирование контактов с ДНК. Для захвата дцДНК-субстрата фермент использует «ладонь» (мотивы А, 2, 6) и домен «большой палец» (мотив 1). Домен «пальцы», смыкаясь над «ладонью», формирует карман (полость) для вновь образуемой пары оснований, главным образом за счет аминокислотных остатков мотива В. Фрагменты, ответственные за фиксацию 3'-конца праймера, встраиваемого нуклеотида и двух необходимых для катализа ионов магния, локализованы на внутренней стороне «пальцев» (мотивы В, 6) и на плоскости «ладони» у основания «пальцев» (мотивы А, С). Активный центр полимераз, в котором осуществляется встраивание нуклеотидов в растущую цепь, расположен на домене «ладони» [40, 42]. Некоторые ДНК-полимеразы содержат дополнительные домены, например, обеспечивающие 3' → 5' экзонуклеазную активность.

Как и ДНК-полимеразы, ДНК-лигазы разных организмов имеют структурно схожий минимальный каталитический центр, формируемый из двух дискретных доменов: N-концевого (AdD) каталитического и меньшего по размеру С-концевого (OB) регуляторного (рис. 2, Б, 3). Активный сайт лигаз образован, в основном, шестью консервативными мотивами (I–VI). Пять из них (I, III, IIIa, IV и V) входят в состав N-концевого домена 1 (AdD) и образуют нуклеотид-связывающий карман. Этот домен отвечает за узнавание и специфическое связывание с АТФ (или NAD<sup>+</sup>), и в нем, в мотиве I, содержится остаток лизина, подвергающийся аденилированию при активации фермента. Через мотив V домен 1 соединяется с олигонуклеотид/олигосахарид связывающим доменом 2 (OB) [43–46]. Связывание ДНК-

субстрата с ферментом происходит в междоменной щели с участием, в т.ч., мотива V [43]. Помимо основных доменов лигазы эукариот содержат на N-конце дополнительный ДНК-связывающий домен (DBD), необходимый для катализа и позволяющий более плотно окружить ДНК-дуплекс [44, 47]. На С-конце NAD<sup>+</sup>-зависимых лигаз находятся домены: «цинковые пальцы» (Zn), «спираль-шпилька-спираль» (HhH) и др. Они являются аналогом DBD-домена, повышают эффективность связывания субстрата и/или точность распознавания повреждений в его составе [44] (рис. 3).

Структурную организацию ДНК-лигаз, так же как ДНК-полимераз, соотносят с формой кисти руки, домен 1 ассоциируют с ладонью, домен 2 – с пальцами [48]. Подобное сопоставление доменов данных ДНК-зависимых ферментов обосновано и при рассмотрении их структурных перестроек, сопровождающих ферментативную реакцию.

#### КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОЦЕССЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

Для проведения эффективного катализа молекулы ДНК-процессирующих ферментов претерпевают конформационные переходы. В ходе каталитического цикла в полимеразы выделяют две основные структурные перестройки (рис. 4). Первая сопряжена со связыванием ДНК-субстрата, который входит в раскрытую щель между «большим пальцем» и «ладонью» фермента. Верхний край «большого пальца», вступая во взаимодействие с субстратом со стороны малой бороздки двойной спирали, склоняется к плоскости «ладони». В результате этой перестройки в молекуле фермента образуется полый цилиндр, внутри которого плотно фиксирован фрагмент спирали ДНК. Далее реализуется второй конформационный переход – поворот «пальцев» к «ладони», сопряженный со связыванием в активном центре полимеразы нуклеозидтрифосфата. Этот переход называют переходом фермента из «открытого» в «закрытое» состояние, он завершает позиционирование и фиксацию субстрата в активном центре фермента. Именно на данном этапе происходит формирование необходимых контактов между доменом «пальцы» и встраиваемым нуклеотидом, что позволяет оценить геометрию переходного состояния,



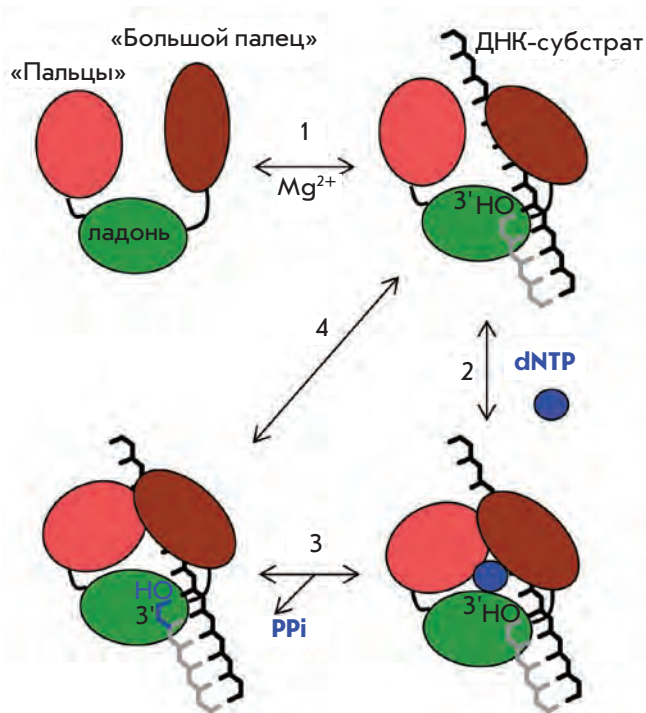


Рис. 4. Схематичное представление конформационных перестроек ДНК-полимераз в ходе ферментативного удлинения ДНК-субстрата

а в результате и комплементарность формируемой пары оснований [49–51].

Изменения структуры фермента сопровождаются подстройками ДНК-субстрата, преимущественно происходящими на этапе образования комплекса дуплекс/полимеразы. На участке ДНК-дуплекса вблизи сайта ферментативного превращения регистрируются изменения структуры углеводно-фосфатного остова, а именно переход остатков дезоксирибозы из C2'-эндо- в C3'-

эндоконформацию. В результате форма малой бороздки значительно изменяется. Она становится более мелкой и широкой. Ширина бороздки резко возрастает с 7 Å (ДНК-спираль в свободном состоянии) до 9–10 Å (в комплексе с ферментом). Таким образом, фрагмент спирали ДНК-дуплекса переходит из В-формы в А-подобную [49, 51, 52] (рис. 5). Данные изменения в структуре фиксированного на ферменте ДНК-субстрата затрагивают не более 4–5 п.н. [49, 51, 52]. При связывании в активном центре дезоксирибозы, т.е. при переходе к «закрытому» комплексу, происходят дополнительные изменения конформации субстрата, затрагивающие одноцепочечный фрагмент матричной цепи, который оказывается четко фиксированным [51].

ДНК-лигазы при проявлении каталитической активности также претерпевают конформационные переходы между «открытым» и «закрытым» состояниями. «Закрытие» фермента начинается при его связывании с нуклеотидными кофакторами, АТФ или NAD<sup>+</sup>, в результате чего подвижный домен 2 сближается с доменом 1 (рис. 6). Молекула АТФ (NAD<sup>+</sup>) координируется в позиции, благоприятной для нуклеофильной атаки ε-аминогруппы консервативного остатка лизина по α-фосфату АТФ (NAD<sup>+</sup>). Кроме того, такая перестройка приводит к формированию непосредственно каталитически активного центра и вызывает поворот ДНК-связывающего домена к активному центру [44, 47, 53, 55]. В результате подобных перестроек только аденилированный фермент приобретает конформацию, способную распознать и захватить ДНК-субстрат [44]. Окончательное «закрытие» фермента происходит при его связывании с ДНК и приводит к тому, что аденилирующий и ОВ-домены, а также DBD или HhN плотно окружают ДНК-субстрат вблизи одноцепочечного разрыва.

По аналогии с данными, полученными для ДНК-полимераз, высказывалось предположение о том, что и в комплексе с ДНК-лигазами часть ДНК-субстрата переходит из В- в А-форму [48]. Одним из установленных фактов, подтверждающих эту гипотезу, было то, что полость между доменами ДНК-лигазы, в которой происходит связывание дуплекса, изогнута, и именно изогнутый В-А

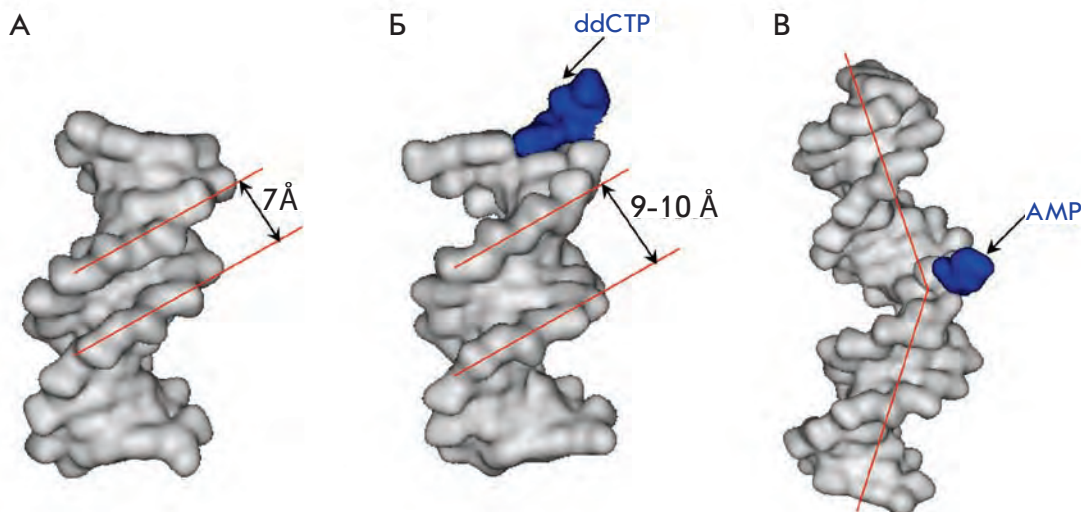


Рис. 5. Изображение структуры В-формы ДНК-дуплекса (PDB 1BNA 12 п.н.) [53] (А), гибридной формы ДНК-субстрата в активном центре Taq ДНК-полимеразы (PDB 3KTQ 12–13 п.н.) [51] (Б), ДНК-лигазы *Chlorella virus* (PDB 2Q2T 21 п.н.) [57] (В)

гибридный дуплекс ДНК, вероятно, может структурно подходить данному сайту активной формы фермента [47]. Позже подобные перестройки субстрата были подтверждены рентгеноструктурным анализом комплексов ДНК с ДНК-лигазой I человека [47]. В данном случае деформация спирали ДНК к А-подобной форме наблюдалась только в части дуплекса со стороны ОН-компонента. Аналогичные данные по комплексам с участием ДНК-лигаз из *E.coli* и *Chlorella virus* [56, 57] свидетельствуют о том, что при связывании с ферментом участки ДНК, расположенные с обеих сторон от одноцепочечного разрыва, частично переходят в А-форму (рис. 5, В). Протяженность таких несколько раскрученных фрагментов ДНК в зависимости от фермента варьирует от одной до шести пар нуклеотидов [47, 48, 55–57].

Отметим, что В → А переход спирали ДНК описан и для других ДНК-зависимых ферментов (например, ДНКаза I) и ДНК-связывающих белков [58]. Считается, что одной из основных причин такой трансформации субстрата является резкая дегидратация двойной спирали в гидрофобной ДНК-связывающей полости фермента, способствующей именно такой перестройке дцДНК.

### БЕЛКОВО-НУКЛЕИНОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, РЕАЛИЗУЕМЫЕ В РЕАКЦИОННОМ КОМПЛЕКСЕ ФЕРМЕНТ/ДНК-СУБСТРАТ

Изменения, происходящие в структурах фермента и субстрата, приводят к их четкой «подстройке» друг к другу, обеспечивая формирование целой сети белково-нуклеиновых контактов на основе водородных и ионных связей, Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. Сеть контактов очень специфична, часто именно консервативные аминокислотные остатки активных центров ферментов вовлекаются в ее формирование. Раскручивание ДНК-дуплекса вблизи активного центра фермента повышает доступность различных центров в малой бороздке двойной спирали для взаимодействия с группировками в структуре белка. Основная часть таких взаимодействий – это тесные сиквенс-независимые контакты, формируемые за счет водородных связей между типичными для любой канонической пары оснований центрами (акцепторами электронов, расположенными в N3 позиции пуриновых оснований и O2 пиримидиновых остатков) и консервативными остатками белка [51, 52, 59, 60]. В свою очередь индуцированная А-форма дуплекса стабилизируется за счет сети Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий аминокислотных остатков с углеводными фрагментами и/или гетероциклическими основаниями нуклеотидов [43, 47, 51, 52].

Участок ДНК, в котором полимеразы семейства А взаимодействуют с малой бороздкой дуплексной структуры, составляет около 4–5 пар оснований от 3'-конца праймерной цепи. Рентгеноструктурным анализом было показано, что к аминокислотным остаткам, формирующим контакты в бороздке, для ряда полимераз семейства А (*Taq*, *Bst* и др.) относятся (например, для *Taq* ДНК-полимеразы):

– аргинин Arg573, который образует водородную связь как с нуклеотидом, расположенным непосредственно на 3'-конце праймера, так и с его компонентом в матрице;

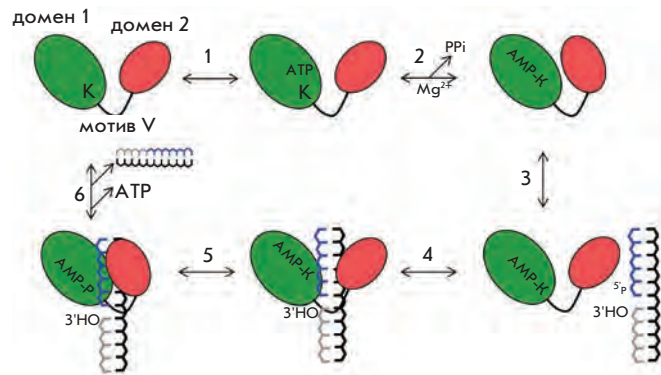


Рис. 6. Схематичное представление конформационных перестроек ДНК-лигазы в ходе ферментативного лигирования ДНК-субстрата с одноцепочечным разрывом. К – консервативный остаток лизина, аденилируемый на первом этапе ферментативной реакции

- глутамин Gln754, который взаимодействует с тем же матричным нуклеотидом;
- аспарагин (Asn583) и лизин (Lys540), контактирующие с нуклеотидами, расположенными в 3-й и 4-й, 5-й позициях от 3'-конца удлиняемой цепи соответственно [51, 61, 62] (рис. 7).

Таким образом, протяженность участка ДНК-комплекса, малая бороздка которого вовлечена в формирование водородных связей, соответствует длине фрагмента ДНК, подверженного переходу спирали в А-форму. Отметим, что нуклеотиды, находящиеся вблизи сайта ферментативного превращения, кроме контактов в малой бороздке формируют способствующие закреплению цепи ДНК в А-форме Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия с остатками аминокислот (гистидин, аргинин, тирозин) [43, 47, 51]. За пределами этого участка, т.е. дальше 4–5 п.н. от сайта элонгации, конформация дцДНК практически полностью соответствует В-форме, что определяет возможность реализации белково-нуклеиновых контактов исключительно с участием остатков углеводно-фосфатного остова, подобные контакты не являются сиквенс-специфичными [43, 51, 52]. Взаимодействия в данной области фермент-субстратного комплекса в основном электростатические и Ван-дер-Ваальсовы. Всего полимеразы семейства А образуют различные контакты с 5–8 парами оснований ДНК-дуплекса от 3'-конца удлиняемой цепи [43, 51, 52, 61], в них участвуют более 40 консервативных аминокислот [63–65] (рис. 7, А, Б).

Кристаллические структуры комплексов ДНК-лигаза/дцДНК-субстрат, имитирующих реакционное состояние, были получены и охарактеризованы относительно недавно и только для некоторых ферментов. До этого были определены лишь размеры участков связывания ДНК-лигаз на субстрате с использованием разных методов футпринтинга. Исследования показали, что размеры участков, накрываемых ферментом на ДНК по обе стороны от одноцепочечного разрыва, различаются. Фермент связывает 7–12 п.н. со стороны Р-компонента и 3–9 п.н. со стороны ОН-компонента [66, 67]. Суммарный участок взаимодействия ДНК-субстратом с лигазой ва-





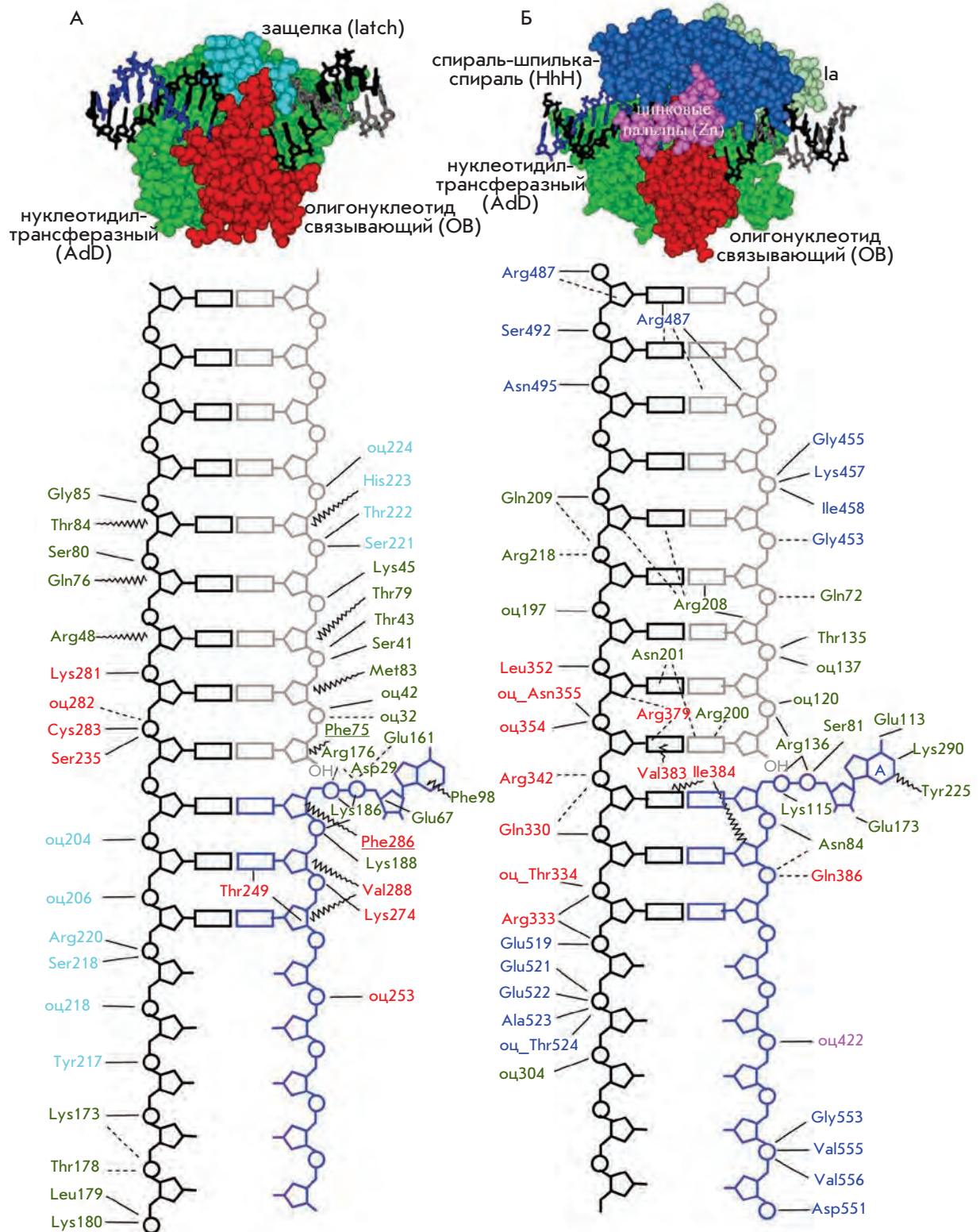


Рис. 8. Схематическое изображение сети белково-нуклеиновых взаимодействий, реализуемых в реакционном комплексе между аденилированным ДНК-субстратом и ДНК-лигазой *Chlorella virus* (А) [57] или ДНК-лигазой *E. coli* (Б) [56, 69]. Показаны прямые контакты (сплошные линии), образованные через молекулы воды (пунктирные линии), Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия (волнистые линии). Аминокислотные остатки разных доменов ферментов изображены разным цветом. Взаимодействия, образуемые основной цепью остатков пептидной цепи фермента, обозначены префиксом «оц». Сверху представлены пространственные структуры соответствующих фермент-субстратных комплексов, полученные с помощью PDB структур 1FVI [51] (А) и 2OWO [56] (Б)



рьюет от 10 до 20 п.о. в зависимости от фермента. Например, для АТР-зависимой ДНК-лигазы бактериофага T7 (41 кДа, 359 аминокислотных остатков (а.о.)) с помощью химического футпринтинга показано, что фермент занимает 3–5 п.о. в направлении 3' → 5' от ника и 7–9 п.н. в противоположном от него направлении вдоль лигируемой цепи [66]. С использованием ферментативного (экзонуклеаза III) футпринтинга установлено, что ДНК-лигаза *Chlorella virus* (34 кДа, 298 а.о.) способна покрывать 19–21 п.н. в ДНК-субстрате, из них 11–12 п.н. со стороны донора 5'-фосфата и 8–9 п.н. по другую сторону одноцепочечного разрыва [67]. Для T4 ДНК-лигазы (55 кДа, 487 а.о.) по данным работ [13, 68] аналогичные характеристики, представленные далее в том же порядке, составили 11–12, 6–7 и 5 п.н. соответственно.

В настоящее время предоставляется возможность систематизации взаимодействий ДНК-лигаз с субстратами, установления схожих по функциональности аминокислотных остатков для ферментов из различных источников. Известно, что комплекс лигазы с ДНК-субстратом сформирован сетью связей, координирующих остаток 5'-концевого фосфата Р-компонента, пронизывающих малую бороздку ДНК-дуплекса вблизи одноцепочечного разрыва, и контактов с углеводно-фосфатным остовом каждой из цепей ДНК-субстрата [47, 56, 57, 69, 70]. На рис. 8, А и В представлена карта тесных контактов, реализуемых между субстратом и ДНК-лигазами *Chlorella virus* и *E.coli*. Доказано, что в формировании связей с ДНК-субстратом участвуют все домены фермента. При этом основная часть точечных межмолекулярных взаимодействий приходится на водородные связи, реализуемые аминокислотными остатками с фосфатными группировками ДНК. Согласно рентгеноструктурным данным такие взаимодействия затрагивают около 8 и 5–6 п.н. со стороны Р- и ОН-компонентов субстрата соответственно [56, 57]. Связи между экспонированными в малую бороздку группировками гетероциклических оснований и аминокислотными остатками фермента затрагивают лишь по две нуклеотидные пары с каждой стороны от одноцепочечного разрыва [56, 57]. Именно такой спиральный участок дуплекса и претерпевает В → А переход в комплексе с данным ферментом [57]. Эта же зона ДНК-субстрата вовлечена в формирование Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий с лигазой. Для целого ряда ДНК-лигаз подобные контакты реализуются за счет остатков аргининов и/или фенилаланинов, встраиваемых в малой бороздке ДНК-дуплекса между углеводными остатками [56, 57]. В случае эукариотических и NAD<sup>+</sup>-зависимых ферментов значительную роль в формировании контактов в малой бороздке играют, соответственно, DBD и HhH домены [56, 57, 69, 70]. Кроме того, для ряда ДНК-лигаз показан изгиб ДНК-субстрата в активном центре фермента (рис. 5, В). В случае ДНК-лигазы *E.coli* показано, что домен HhH, образуя контакты с фосфодиэфирным остовом в четырех позициях, стабилизирует вблизи ника изгиб главной оси спирали ДНК, равный по величине 10° [57] (рис. 8, В). Авторы отмечают, что мотив HhH, образованный пятью α-спиральными субмотивами, обнаружен во многих ДНК-связывающих белках [57, 71, 72].

### ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЭФФЕКТИВНОЕ ПРОЦЕССИРОВАНИЕ ДНК-СУБСТРАТА В ХОДЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

Существует множество предположений о факторах, определяющих чувствительность ДНК-зависимых ферментов к наличию неканонических пар оснований в распознаваемой части ДНК-субстрата, т.е. факторов, обуславливающих селективность действия ферментов, в частности ДНК-лигаз и ДНК-полимераз. Ниже будут представлены только некоторые из них.

В качестве критериев реализации ферментативного катализа долгое время выделяли наличие канонических водородных уотсон-криковских связей вблизи процессируемой части субстрата и/или их стабильность, а также стабильность субстратного комплекса в целом, в контексте изучения модельных систем на основе олигонуклеотидов. Механизм, с помощью которого достигается селективное превращение субстратов, не выяснен полностью до настоящего времени. Все больше фактов свидетельствует в пользу того, что контакты между ферментом и субстратом не только способствуют фиксации и подстройке последнего в активном центре, но и ответственны за распознавание субстратов, содержащих мисматчи или другие возмущения регулярной структуры ДНК.

Одним из критериев определения ферментами несоответствий в составе ДНК может оказаться вызываемое мисматчами искажение ДНК-спирали за счет своей неканонической формы. Данное утверждение подтверждается на примере 5-фторурацила, образующего пару с гуанином (рис. 9). Такая модифицированная пара является «качающейся», т.е. в зависимости от pH раствора может находиться в виде пары, схожей по форме с уотсон-криковской C/G или отличной от нее (рис. 9) [73]. Присутствие в сайте протекания реакции лигирования стабильной, но неканонической по форме пары оснований значительно снижает выход реакции в случае *Tth* и T4 ДНК-лигаз относительно пары 5-фторурацил/гуанин, обладающей геометрией, аналогичной геометрии комплементарной пары [73]. Неканоническая форма нуклеотидных пар: урацил/гуанин, урацил/гипоксантин (рис. 9) также приводит к снижению эффективности лигирования *Tth* лигазой ДНК-комплексов,

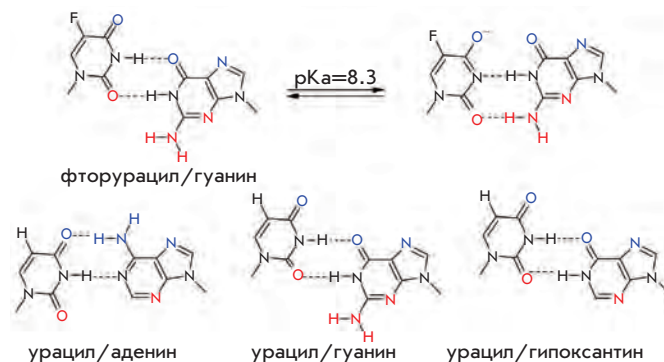


Рис. 9. Модифицированные пары оснований неканонической формы. Синим и красным обозначены атомы – доноры/акцепторы водородных связей, обращенные в большую и малую бороздки соответственно

содержащих подобные пары в сайте одноцепочечного разрыва. Показано, что замедление ферментативной реакции происходит на этапе аденилирования ДНК-субстрата [73].

Еще одной составляющей обеспечения селективности ферментативного процесса является формирование ферментом водородных связей в малой бороздке субстратного ДНК-комплекса. Дело в том, что акцепторы водородных связей гетероциклических оснований, обращенные в малую бороздку, однотипно расположены для всех четырех правильных пар оснований (учитывая различную роль процессируемой и матричной цепей ДНК-субстрата) и отличаются для некоплементарных пар [59] (рис. 10, А). Подобная топологическая особенность может способствовать различению мисматчей и совершенных пар. Косвенным доказательством важности подобных контактов может служить и то, что, например, ДНК-полимераза  $\beta$  человека и обратная транскриптаза ВИЧ-1 (HIV RT), образующие лишь одну связь в малой бороздке спирали ДНК, характеризуются беспорядочным удлинением ДНК-дуплексов с мисматчем(ами) по сравнению с полимеразы семейства А, формирующими многоточечные контакты [60, 74].

Роль фермент-субстратных контактов в малой бороздке исследовали с использованием как аналогов нуклеотидов в составе ДНК, так и мутантных форм ферментов. Из представленных ранее структур фермент-субстратных комплексов видно, что основания пары нуклеотидов в сайте ферментативного превращения всегда задействованы в формировании водородных связей с аминокислотными остатками. Для установления важности таких контактов в качестве одного из нуклеотидов этой пары вводили различные неприродные аналоги: 3-деазогуанин (аналог гуанина) [75, 76], 2,4-дифтортолуол (аналог тимидина) [73, 77], 4-метилбензимидазол (аналог аденозина) [77] (рис. 10, Б). Присутствие в ДНК-субстрате подобных модифицированных нуклеотидов, схожих по форме с природными аналогами, но не содержащих в малой бороздке акцепторов водородных связей, становилось одной из причин прерывания ферментативной реакции с участием как ДНК-полимераз (фрагмент Кленова [75, 77], *Taq*, T7, HIV RT, полимераз  $\alpha$  и  $\beta$  [77]), так и ДНК-лигаз (*Tth* и T4) [73]. Только для случая расположения модифицированного аналога непосредственно в сайте ферментативного превращения было показано значимое снижение эффективности реакции с участием ДНК-полимераз [77]. Введение аналогов нуклеотидов в разные цепи субстрата выявило для рассмотренных ДНК-полимераз, что для протекания ферментативной реакции необходимо формирование водородных связей в малой бороздке со стороны праймерной цепи и только в случае HIV RT в матричном компоненте [77].

Рассмотрение роли взаимодействий в малой бороздке с точки зрения структуры фермента проводили с использованием мутантных форм фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E.coli* (фрагмент Кленова) [76, 78, 79]. Мутанты R668A и Q849A имели замены аминокислот, вовлекаемых в исходном ферменте в формирование водородных связей с гетероциклическими основаниями 3'-концевой пары нуклеотидов удлиняемой и матричной цепей соответственно. Функциональные аминокислотные остатки заменяли на аланин, боковой радикал которого не имеет доноров водородных связей. Замена R668A приводила

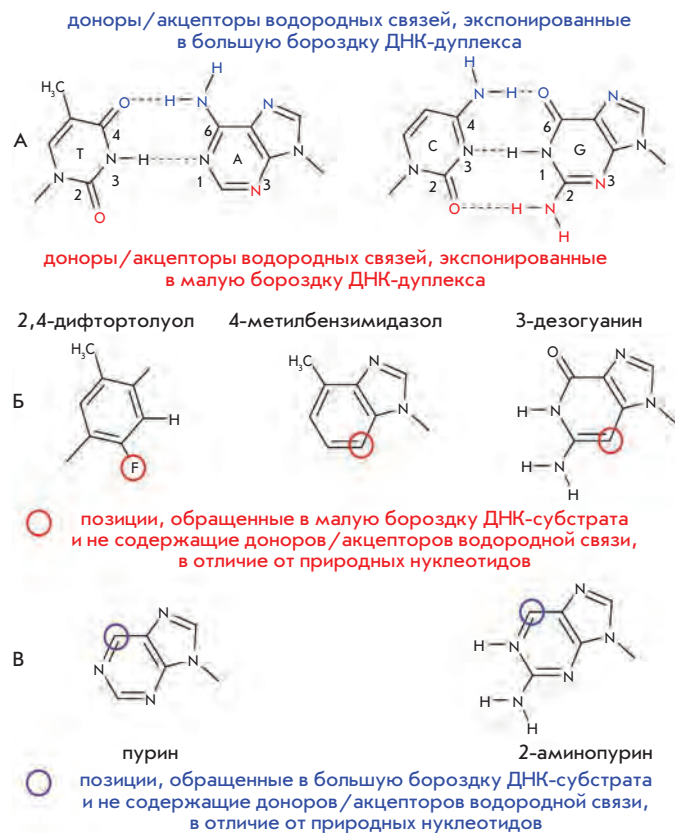


Рис. 10. Расположение доноров/акцепторов водородных связей в малой и большой бороздках уотсон-криковских пар оснований (А). Модифицированные основания, не содержащие доноров/акцепторов водородной связи в соответствующих позициях в малой (Б) или большой (В) бороздках спирали дцДНК. Синим и красным обозначены атомы – доноры/акцепторы водородных связей, обращенные в большую и малую бороздки соответственно

к снижению эффективности фермент-субстратного взаимодействия в случае комплементарного комплекса и практически не меняла процессирование субстрата с 3'-мисматчем [76, 78, 79]. Замена Q849A не влияла на распознавание ферментом ДНК-субстрата [78]. Таким образом, на примере использования мутантных форм ДНК-полимераз была подтверждена важность реализации контактов в малой бороздке как фактора, определяющего эффективное процессирование субстрата, при этом, как и в случае модифицированных аналогов нуклеотидов, была показана необходимость формирования водородных связей в малой бороздке ДНК со стороны удлиняемой цепи.

Существуют данные, что для эффективной ферментативной реакции не важна природа заместителей, обращенных в сторону большой бороздки ДНК-субстрата и находящихся, например, в шестом положении гетероциклических оснований. В качестве подобных аналогов нуклеотидов были рассмотрены 2-аминопури́н и пури́н, образующие пару с урацилом (рис. 10, В) [73]. Наличие модифицированных оснований в -1 или +1 положении от ника не приводило к значительному снижению эффективности ферментативной реакции, проводимой с помощью *Tth* или T4 ДНК-лигаз [73].

В ряде случаев для эффективного протекания ферментативной реакции реализация контактов в малой бороздке может быть менее принципиальна, чем некоторые другие взаимодействия. Данные получены при исследовании мутантных форм ДНК-полимераз семейства А (*Taq*, фрагмент Кленова) по консервативному мотиву Gln-Val-His (QVH), входящему в состав мотива С [43, 80]. Известно, что данный мотив взаимодействует с дезоксирибозой 3'-концевого нуклеотида праймера, при этом остаток гистидина может быть включен в образование водородной связи с малой бороздкой дуплекса. Были получены мутанты ДНК-полимераз, проявляющие повышенную способность к дискриминации субстратов с мисматчами (в некоторых случаях даже удаленных на 2–4 нуклеотида от сайта ферментативного превращения [80]) по сравнению с ферментами дикого типа. Из них наиболее селективными оказались мутанты PLQ, LVG, LVL для фрагмента Кленова, ILL, IVF, CLV для *Taq* полимеразы. Из всех полученных мутантов только PLQ содержал глутамин вместо гистидина, имидазольное кольцо которого могло выступать в качестве донора электронов. В большинстве случаев гистидиновый остаток был замещен аминокислотами с неполярными боковыми радикалами (лейцин, валин, глицин, фенилаланин) [80]. Можно предположить, что в данном случае более важным оказывается реализация гидрофобных взаимодействий, способствующих, в т.ч., стабилизации А-формы дуплекса вблизи сайта ферментативного превращения.

В случае мутантов фрагмента Кленова: N675A, R835L, R836A, R841A и N845A наблюдалось снижение селективности [78]. Причина влияния данных мутаций на точность удлинения ДНК-субстрата не вполне очевидна. Авторы предполагают, что аминокислота N845 может быть ответственна за распознавание «правильности» формы 3'-концевой пары нуклеотидов. Остатки R835, R836, R841, взаимодействуя с одноцепочечным участком матричной цепи, могут способствовать стабилизации изгиба, наблюдаемого в данном фрагменте ДНК. Аминокислота N675 взаимодействует с матрицей в позиции перехода структуры ДНК из В- в А-форму и, следовательно, может отвечать за фиксацию подобного конформационного искажения.

Замены в аминокислотной последовательности ДНК-лигаз также могут приводить к изменению эффективности лигирования субстрата. Так, на примере аналогов ДНК-лигазы *E.coli* с заменами наиболее консервативных аминокислот в ОВ домене: R379A, V383A, I384A и R333A-T334A было показано значительное снижение эффективности лигирования, составившей не более 10 % относительно исходного фермента [69]. Причины изменения эффективности лигирования, определяемые функциями соответствующих аминокислотных остатков, связаны с влиянием на образование водородных связей в малой бороздке со стороны матричной цепи ОН-компонента (аминокислота R379), на взаимодействие с углеводным остовом матричной цепи (R333 и T334), на образование сети Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий с парами оснований вблизи одноцепочечного разрыва (с двумя парами ОН-компонента и одной Р-компонента) для стабилизации ДНК-субстрата в А-форме (V383 и I384) [69]. Для ДНК-лигаз семейства *Thermus* (ТАК16D и АК16D) был выявлен ряд мутантов с повышенной точностью выявления 3'-концевых одиноч-

ных мисматчей: мутантные формы D286E, G287A, V289I, K291R по AdD домену [81] и T599A по домену BRCT [82] соответственно. В случае *Tth* лигазы было обнаружено, что использование мутантов K294R, K294P приводит к повышению селективности реакции [30]. Однако причины, приводящие к подобным результатам, не установлены. Известно, что данные аминокислоты задействованы на разных этапах ферментативной реакции, скорее всего повышение селективности является результатом комплексного эффекта на нескольких стадиях лигирования.

Таким образом, селективность ферментативных реакций во многом определяется реализацией «правильных» контактов в фермент-субстратном комплексе. Вероятнее всего, именно совокупность точечных взаимодействий в данном комплексе обеспечивает выявление несовершенных участков в дцДНК-субстрате.

### **ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИЙ, ВОЗМУЩАЮЩИХ СТРУКТУРУ ДНК-СУБСТРАТА, НА СЕЛЕКТИВНОСТЬ ЕГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ**

В предыдущей главе нами было рассмотрено строение ДНК-зависимых ферментов и образуемых ими комплексов с субстратами с точки зрения выявления факторов, обеспечивающих селективность ферментативного превращения. В данной главе будет рассмотрено влияние строения субстратного ДНК-комплекса на возможность повышения селективности ферментативной реакции. Одним из наиболее простых способов повышения наблюдаемой селективности ферментативного лигирования, вероятно, является способ, основанный на использовании «модифицированных» зондов – тандемов коротких олигонуклеотидов [83–85]. Наличие среди лигируемых компонентов минизондов, пента- или даже тетра-нуклеотидов делает такие составные комплексы менее эффективными субстратами, селективность ферментативного превращения которых оказывается высокой [83, 85]. Так, в случае использования тетра-нуклеотида в качестве центральной части трехкомпонентного тандема факторы дискриминации практически любых мисматчей, располагаемых в соответствующей зоне субстратного комплекса, оказываются выше 300 при использовании мезофильной Т4 ДНК-лигазы [85]. Столь высокая селективность действия фермента не достигается, если ДНК-дуплекс формируется олигонуклеотидами, длина которых достаточна для оптимального связывания белковой молекулы на субстрате [например, 37].

### **ВВЕДЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО НЕСООТВЕТСТВИЯ**

Еще один способ повышения селективности фермент-зависимых реакций, не связанный с использованием модифицированных производных нуклеотидов, основан на использовании ДНК-субстратов с дополнительным, преднамеренно сформированным мисматчем по соседству с анализируемым полиморфным сайтом. Эффективность данного способа была продемонстрирована для реакций с участием *Taq* ДНК-полимеразы [14, 86–90] и *Tth* ДНК-лигазы [30]. В данном методе значимый мисматч располагают на 3'-конце удлиняемого олигонуклеотида или лигируемого ОН-компонента, а дополнительный вводят вблизи



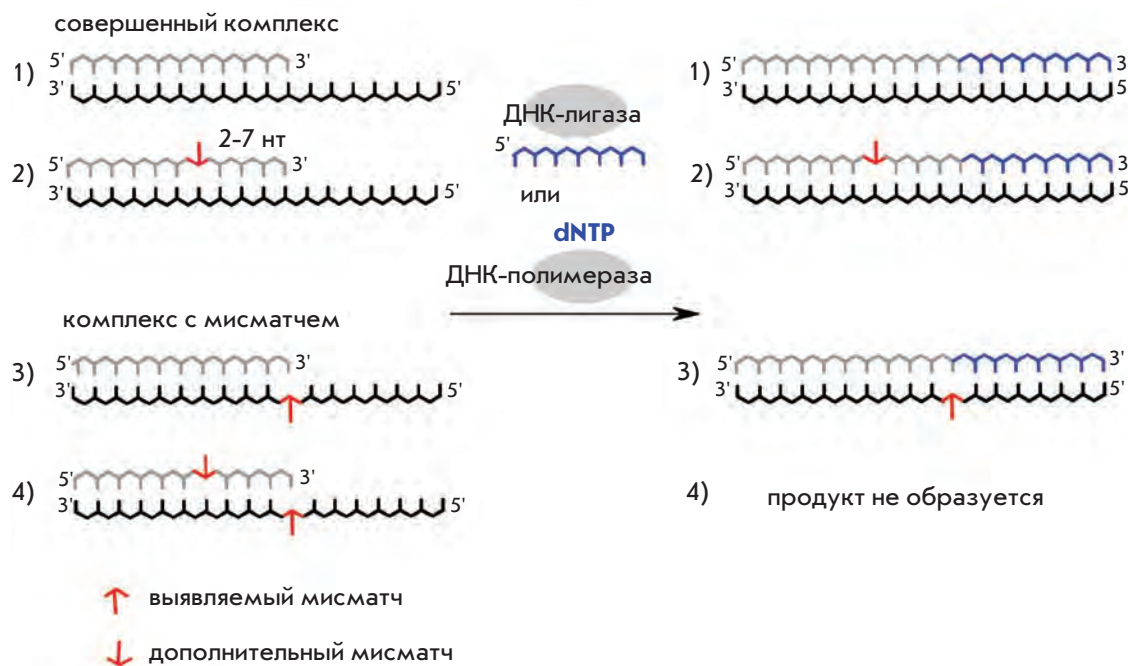


Рис. 11. Схема выявления некомплементарной пары в составе ДНК-субстрата в ходе его ферментативного превращения с использованием дополнительного преднамеренного мисматча

3'-конца, а именно во 2-ю, 3-ю, 4-ю позиции [14, 30, 88–90], а в некоторых случаях в 5-ю и 7-ю [86]. Таким образом, в этих случаях «совершенный» комплекс имеет одиночную преднамеренно введенную некомплементарную пару, а комплекс с выявляемым мисматчем содержит в результате два возмущения (рис. 11).

Сравнение эффективности накопления полноразмерного продукта удлинения или лигирования показало, что единственная некомплементарная пара не приводит к значительному снижению эффективности превращения ДНК-субстрата, а двойной мисматч способен снижать выход конечного продукта в некоторых случаях до 100 и более раз [14, 30, 88]. Исключение наблюдалось только в случае субстратного комплекса с 3'-концевым мисматчем 3'-Т/Н, когда введение второго мисматча в предпоследнюю позицию снижало выход продукта всего в 5–10 раз, а наличие двух расположенных рядом 3'-Т/Н мисматчей снижало выход в 2–5 раз, что слабо отличается от эффективности удлинения совершенного комплекса [14]. Было исследовано влияние позиции преднамеренного нуклеотидного несоответствия на снижение ложно-положительного сигнала при процессировании олигонуклеотидных зондов [14, 30, 86, 88, 90]. Дополнительный мисматч в любой из описанных выше позиций приводил к повышению эффективности дискриминации исходного несоответствия. Однако преднамеренный мисматч во 2-й позиции в ряде экспериментов приводил к сильному снижению эффективности ферментативной реакции. Так, для реакции с участием *Tth* ДНК-лигазы даже в случае комплементарной пары на 3'-конце олигонуклеотида падение эффективности образования продукта происходило в 175 раз [30]. Некомплементарная пара в 4-й позиции, наоборот, в ряде случаев недостаточно повышала селективность [86, 90]. Из всех рассмотренных позиций введения дополнительного мисматча для повы-

шения эффективности выявления значимого мисматча в сайте ферментативного превращения, как в процессе реакции наращивания, так и лигирования, оптимальной оказывалась третья пара нуклеотидов от 3'-конца [30, 88, 90]. Для реакций удлинения было показано, что конечный выход продукта, содержащего некомплементарную пару на 3'-конце, в таком случае не превышает 5 % [90]. Для реакций лигирования при введении внутреннего мисматча точность ферментативной реакции, выражаемая как соотношение начальных скоростей превращения комплекса с комплементарной парой на 3'-конце и комплекса с мисматчем в данной позиции, увеличивалась в 4 раза [30].

Таким образом, дополнительный мисматч, введенный в структуру ДНК-субстрата одновременно со значимой однонуклеотидной заменой, приводит к повышению селективности фермент-зависимых реакций. Наблюдаемые закономерности обусловлены, скорее всего, тем, что два расположенных недалеко друг от друга нуклеотидных несоответствия приводят к более значительному возмущению распознаваемой ферментом части ДНК-комплекса и, следовательно, к большему изменению стабильности и геометрии ДНК-спирали. В результате двойной мисматч относительно одиночного более значительно снижает эффективность ферментативной реакции. Однако введение дополнительных однонуклеотидных мутаций вряд ли можно назвать универсальным способом повышения селективности в силу сиквенс-зависимости подобных «возмущений» структуры ДНК.

#### МОДИФИКАЦИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ПОВЫШАЮЩИЕ СЕЛЕКТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ДНК-ЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ

В настоящее время олигонуклеотиды, содержащие в своем составе модифицированные основания или измененный



углеводно-фосфатный остов, занимают отдельную нишу в дизайне зондов для гибридизационного анализа ДНК. Одни модификации (PNA – пептидилнуклеиновые кислоты [91], LNA и ENA – «замкнутые» нуклеиновые кислоты [92, 93]) повышают стабильность модифицированных комплексов, что используется для увеличения точности ДНК-анализа на уровне образования гибридизационного комплекса. Другие модификации (N4-алкилцитозин [94], 5-метил- или 5-(1-пропаргил)урацил [95]) могут выравнивать гибридизационные свойства комплексов с отличающимся нуклеотидным составом, что важно при параллельном анализе различных последовательностей ДНК. Следует отметить, что не все модификации олигонуклеотидов совместимы с ДНК-зависимыми ферментами, поскольку их введение в структуру ДНК-субстрата может затруднять образование необходимых для эффективного протекания ферментативной реакции белково-нуклеиновых взаимодействий. Тем не менее введение некоторых аналогов нуклеотидов может стать способом повышения селективности выявления мисматчей ферментами в составе модифицированных ДНК-дуплексов (табл. 3).

#### МОДИФИКАЦИИ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ОСНОВАНИЙ

Одним из примеров используемых модификаций является синтетический аналог дезоксирибонуклеотида, несущий универсальное основание 3-нитропиррол. «Универсальность» такого основания выражается в том, что оно может образовывать пары со всеми природными основаниями, поскольку обладает небольшими размерами, сопоставимыми с размерами природных нуклеотидов, и при этом сохраняет способность вступать в стэкинг-взаимодействия. Было исследовано влияние такого аналога на селективность *Tth* ДНК-лигазы [30] при его введении в третье положение от дискриминируемой пары, расположенной на 3'-конце ОН-компонента. Выбор позиции обусловлен результатами по повышению селективности за счет дополнительного мисматча, для которого было установлено оптимальное расположение в -3 позиции от сайта ферментативного превращения. Наличие нуклеотидного аналога приводило к увеличению селективности лигирования *Tth* ДНК-лигазой в 9 раз, что в 2.5 раза больше, чем в случае повышения селективности за счет введения дополнительного мисматча на основе канонических оснований. Для реакции с участием *Taq* полимеразы также было зафиксировано снижение выхода образования продукта ПЦР в случае одиночного мисматча и праймера, содержащего 3-нитропиррол, относительно нативного праймера [96]. Некоторым недостатком использования универсальных оснований может оказаться затруднительное прогнозирование связывания олигонуклеотидов, содержащих подобные аналоги, на соответствующей ДНК-матрице.

Другим нуклеотидным аналогом, повышающим эффективность дискриминации мисматчей *Tth* ДНК-лигазой, в случае его введения в структуру зонда оказывается 4-нитроимидазол дезоксирибонуклеотид, образующий с гуаниновым основанием пару менее стабильную относительно нативной С/С-пары [97]. Использование модифицированных по крайней мере двумя подобными аналогами зондов позволило снизить соотношение выходов продуктов лиги-

рования комплекса с мисматчем к «правильному» субстрату в среднем на 15 % относительно применения нативных олигонуклеотидов [97].

Действие представленных модификаций основано на том же принципе, что и введение дополнительного мисматча вблизи выявляемого полиморфизма. Введение модификаций приводит к дестабилизации ДНК-дуплекса, которой оказывается достаточно для снижения эффективности ферментативного превращения только в случае наличия в структуре дуплекса анализируемой несовершенной пары нуклеотидов. С другой стороны, в литературе представлены производные – 7-деазагуанин и инозин, снижающие стабильность дуплексов, но не повышающие селективность *Tth* ДНК-лигазы при одновременном введении в структуру ДНК-субстрата с мисматчем [97]. Это, вероятно, может быть обусловлено возникающими в случае данных модификаций стерическими затруднениями.

Таким образом, хотя аналоги нуклеотидов, модифицированные по гетероциклическим основаниям, способны формировать водородные связи с нативными нуклеотидами, очевидно, что образуемые ими связи отличны от уотсон-криковских. Это может оказаться одной из причин возмущения спирали ДНК. Использование в гибридизационном анализе олигонуклеотидов, модифицированных по углеводно-фосфатному остову, может быть более обосновано, поскольку в данном случае не затрагивается часть нуклеотида, ответственная непосредственно за его комплементарное связывание с НК-матрицей.

#### МОДИФИКАЦИИ УГЛЕВОДНОГО ОСТАТКА

К подобным производным олигонуклеотидам относят олигомеры, содержащие модифицированные бициклические РНК-подобные звенья с 2'-О, 4'-С метиленовыми и 2'-О, 4'-С этиленовыми мостиками – LNA (Locked Nucleic Acid) [98–102] и ENA (Ethylene Nucleic Acid) [103] соответственно.

Для LNA- и ENA-содержащих олигонуклеотидов показано их повышенное родство к комплементарной НК-матрице, это свойство используется для выявления мисматчей при проведении ПЦР за счет повышенной специфичности их комплексообразования [93]. Праймеры с одиночной LNA-модификацией непосредственно на 3'-конце или в предпоследней позиции или несущие ENA-аналог в третьем положении не только не снижают эффективность удлинения *Taq* ДНК-полимеразой модифицированных праймеров в случае совершенного ДНК-субстрата, но и способствуют дискриминации 3'-концевых мисматчей при формировании несовершенного ДНК-комплекса [98–103]. Так, включение модификаций в 3'-концевую область олигонуклеотида снижает выход продукта ПЦР при наличии «трудновыявляемых» мисматчей (С/А, Т/С, С/Т), по крайней мере, на 50 % относительно случая использования нативного праймера [98, 99, 103]. Причина такого редактирования селективности олигонуклеотидами с бициклическими аналогами может быть связана с изменением поведения модифицированного ДНК-субстрата в активном центре фермента. Наличие замкнутого «мостика» приводит к закреплению рибозы нуклеотида в 3'-эндоконформации [104], свойственной нуклеотидам дцДНК-спирали в А-форме. Кроме того, изначально пред-

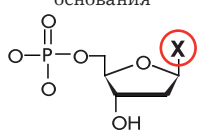
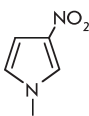
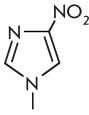
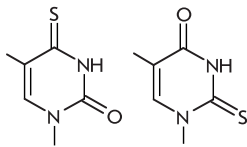
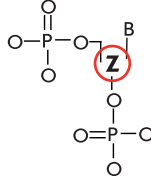
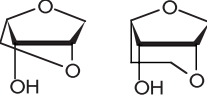

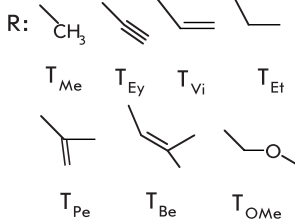
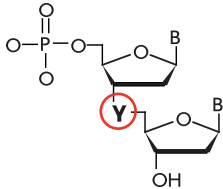
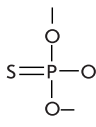
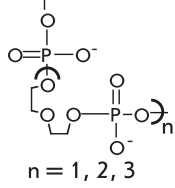
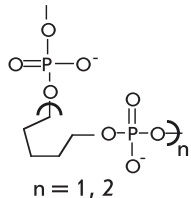
формированный модифицированный нуклеотид оказывается менее конформационно подвижен. Таким образом, LNA- и ENA-модификации способствуют фиксации ДНК-субстрата в А-форме, что благоприятно для реализации контактов белка в малой бороздке ДНК-субстрата.

Еще один тип модификации углеводного остатка в ДНК-зонде, введение которой повышает селективность действия ДНК-полимераз, это С4'-алкилированные тимино-вые нуклеотиды  $T_R$  [105–108]. Для данных модификаций, вызывающих появление нетипичных для ДНК-дуплексов группировок в малой бороздке, первоначально была определена эффективность удлинения модифицированного по 3'-концевой позиции олигонуклеотида в зависимости от размеров алкильного остатка и типа используемой ДНК-полимеразы [107]. ДНК-полимераза археи *Thermococcus litoralis* (*Vent*) оказалась способной наращивать модифицированный олигонуклеотид даже при наличии в его составе относительно объемного винильного остатка, тогда как ДНК-полимераза археи *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) может удлинять праймер, несущий только минимальный из рассмотренных метильный заместитель. *Taq* полимеразы оказалась не способна удлинять модифицированные олигонуклеотиды. Авторы предполагают, что потеря способности удлинять праймер, содержащий 3'-концевой нуклеотид с объемным заместителем при С4', связана со стерическими ограничениями и для каждой из полимераз

объясняется размерами и формой ее активного центра [107]. С4'-алкилдезоксиритобимидин повышает дискриминацию 3'-концевого мисматча не только когда является одним из нуклеотидов, образующих несовершенную пару, но и когда образует вторую или третью пару от конца праймера [105]. При этом для зонда с 3'-модифицированным звеном эффективность дискриминации 3'-концевого мисматча возрастает с увеличением размеров заместителя в С4'-положении дезоксирибозы. В частности, для *Vent* полимеразы селективность достройки праймера нарастает в представленном ряду:  $T < T_{Me} < T_{Ey} < T_{Vi}$  (структуру см. в табл. 3).

Величина  $\Delta\Delta C_t$ , равная разнице номера порогового цикла при сопоставлении ПЦР для случаев формирования модифицированным (С4'-этил) праймером совершенного и 3'-мисматч-содержащего комплексов с ДНК, достигает значения 8.5 циклов. В то же время соответствующее значение при использовании немодифицированного праймера близко к нулю [107]. Наблюдаемый эффект повышения селективности ПЦР проявляется и при наличии мисматчей, отстоящих даже на 4 п.н. от сайта превращения [106]. Авторы отмечают, что введение подобных неполярных заместителей в олигонуклеотидные праймеры не приводит к дестабилизации их комплексов с ДНК, и проявляемые при ПЦР особенности не зависят от буферных условий или нуклеотидного состава формируемых дуплексов. Та-

Таблица 3. Модификации олигонуклеотидов, повышающие селективность действия ДНК-зависимых ферментов

модификации гетероциклического основания	модификации углеводного остатка	модификации межнуклеотидного фосфата
 <p>3-нитропиррол [30, 96]</p>  <p>4-нитроимидазол [97]</p>  <p>C2, C4-тиотимидин [109]</p> 	 <p>2'-О, 4'-С метиленирибоза (LNA) [98–102], 2'-О, 4'-С этиленирибоза (ENA) [103]</p>  <p>С4'-алкилрибоза [105–109]</p>  <p>R:</p>  <p><math>T_{Me}</math> <math>T_{Ey}</math> <math>T_{Vi}</math> <math>T_{Et}</math> <math>T_{Pe}</math> <math>T_{Be}</math> <math>T_{OMe}</math></p>	 <p>Тиофосфат [110–112]</p>  <p>Олигоэтиленгликоль [13, 113]</p>  <p><math>n = 1, 2, 3</math></p> <p>Олигометилендиол [13, 113]</p>  <p><math>n = 1, 2</math></p>

ким образом, наблюдаемые эффекты повышения селективности действия ДНК-полимеразы являются следствием возмущения сети фермент/субстратных взаимодействий, вызванных экспонированными в малую бороздку группировками С4'-заместителей.

В продолжение исследований авторами была использована комбинация модификаций. В состав олигонуклеотидного праймера на его 3'-конец вводили модифицированный тимидин, содержащий 4'-С-метоксиметиленовый остаток в дезоксирибозе в комбинации с тиогруппой в С2 или С4 положении тиминового основания [109]. В реакциях с участием *Vent* ДНК-полимеразы и однотипно модифицированными праймерами повышение эффективности распознавания 3'-концевого мисматча наблюдалось только в случае использования углевод-замещенного олигонуклеотида ( $T_{\text{оме}}$ ,  $\Delta C_i = 9$ ). Наличие тиогруппы в положении С2 основания ( $^{2\text{ST}}$ ) приводило лишь к незначительному возрастанию селективности ПЦР ( $^{2\text{ST}}$ ,  $\Delta C_i = 3$ ), а в С4 – не изменяло ее ( $^{4\text{ST}}$ ,  $\Delta C_i \approx 0$ ). В то же время одновременное присутствие метоксиметиленового остатка и модификации в гетероциклическом основании вызывает кардинальное увеличение дискриминирующей способности ДНК-полимеразы. Наблюдаемые для двояко модифицированных праймеров  $^{2\text{ST}}T_{\text{оме}}$  и  $^{4\text{ST}}T_{\text{оме}}$  величины  $\Delta C_i$  составили 12 и 19 циклов соответственно.

Таким образом, продемонстрировано, что благодаря согласованию различных типов модификаций праймера можно достигнуть значительного повышения селективности действия фермента по отношению к нуклеотидным несоответствиям в ДНК-субстрате. К наиболее вероятным причинам подобных свойств модифицированных ДНК-комплексов можно отнести стерические препятствия, возникающие как в случае заместителя в рибозе, так и дополнительно за счет тиогруппы, влияние которых на протекания ферментативной реакции, по-видимому, особенно драматично в случае нахождения в противоположной цепи напротив нуклеотидного аналога некомплементарного основания. С другой стороны, при формировании фермент-субстратного комплекса для 3'-концевого нуклеотида праймера важна реализация гидрофобных контактов, что обсуждалось в предыдущей главе. Неполарные заместители, вероятно, могут способствовать данным контактам.

### МОДИФИКАЦИИ МЕЖНУКЛЕОТИДНОГО ФОСФОДИЭФИРНОГО ОСТАТКА

Повышение селективности действия ДНК-полимераз было показано и при использовании модифицированных по межнуклеотидному фосфодиэфирному остатку олигонуклеотидных праймеров [110–112]. Замена природных фосфатных группировок, расположенных между первым и вторым нуклеозидами от 3'-конца праймера, на тиофосфатные увеличивала способность распознавания *Vent*, *Pfu* ДНК-полимеразы субстрата с 3'-концевым мисматчем [110–112]. Такие модификации не приводят к значительным изменениям стабильности протяженных ДНК-комплексов, и, тем не менее, их наличие повышает дискриминацию даже отдаленных от сайта ферментативного превращения нуклеотидных несоответствий, как одиночных, так и мультиплексных. Удлинения модифицированного олигонуклеотида

ДНК-полимеразы не наблюдалось при наличии мисматчей, удаленных даже на 8 нуклеотидов от 3'-конца праймера [111]. Отметим, что согласно представленным выше данным ДНК-полимеразы вплоть до этого положения праймерной цепи взаимодействуют с ДНК, формируя тесные контакты с углеводно-фосфатным остовом двойной спирали. В то же время авторы отмечают, что для строго обеспечения селективности ферментативной реакции при использовании фосфотиоатных аналогов олигонуклеотидов необходимо выбирать ДНК-полимеразы с экзонуклеазной корректирующей активностью и проводить подбор условий аллель-специфичной ПЦР [112].

Повышенная относительно нативных ДНК-дуплексов эффективность дискриминации одиночных мисматчей в ДНК-субстратах как в ходе ферментативного лигирования с помощью ДНК-лигазы фага T4, так и удлинения *Taq* ДНК-полимеразой была продемонстрирована на примере использования олигонуклеотидных зондов, несущих ненуклеотидные вставки в углеводно-фосфатном остове [13, 113]. Наличие вставок на основе фосфодиэфиров олигоэтиленгликолей и олигометилендиолов внутри сайта связывания фермента на ДНК-субстрате или на его границе приводит к значительному повышению наблюдаемой селективности превращения модифицированного зонда. В комплексах с ненуклеотидным выпетливанием ферменты дискриминируют даже удаленные от сайта ферментативного превращения мисматчи. Факторы дискриминации мисматча, удаленного от сайта превращения на шесть нуклеотидов, при использовании зондов на основе олигонуклеотида со вставкой в шестом положении достигают 8 при лигировании и 12 при его удлинении. Использование в аналогичном комплексе нативного зонда не обеспечивает надежной дискриминации однонуклеотидного несоответствия в матричной цепи – факторы дискриминации мисматча при лигировании и при полимеризации составляют 2.9 и 1.2 соответственно [13].

Авторы отмечают, что наличие ненуклеотидного выпетливания в составе субстратных дуплексов является своего рода возмущением структуры субстрата, которое в любом случае препятствует ферментативному катализу, однако присутствие дополнительного возмущения в виде мисматча значительно повышает вероятность его дискриминации, что и обуславливает наблюдаемое повышение селективности аллель-специфичной ферментативной реакции.

Таким образом, введение «возмущающих» элементов в структуру ДНК-субстрата ферментативных реакций в некоторых случаях может способствовать достижению желаемой достоверности распознавания нуклеотидных несоответствий в его составе. Искусственно сформированные особенности строения ДНК-комплекса могут приводить к повышению селективности ДНК-лигаз и ДНК-полимераз, однако часто наблюдаемый эффект происходит на уровне общего снижения эффективности ферментативного превращения. Можно предполагать, что наиболее эффективным способом повышения селективности окажется использование модификаций, которые будут влиять на точность ферментативной реакции на уровне стабилизации реакционного комплекса в правильной конформации и способствовать реализации необходимых фермент-субстратных взаимодействий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные, представленные в обзоре, доказывают, что проблема обеспечения высокой селективности ферментативных превращений олигонуклеотидных зондов при проведении анализа нуклеотидных полиморфизмов в ДНК является многопараметрической. Можно утверждать, что универсальная схема анализа, обеспечивающая однозначную дискриминацию любых нуклеотидных вариаций в ДНК с помощью представленных аналитических подходов, до сих пор не разработана. При выборе схемы анализа ДНК необходимо проводить комплексный дизайн компонентов аналитической системы, учитывающий «две стороны одной медали» – во-первых, особенности распознавания субстратных комплексов ДНК-процессирующим ферментом и, во-вторых, непосредственно факторы структуры ДНК-субстрата, формируемого с помощью молекулярного зонда на основе олигонуклеотида или его производного. В обзоре систематизированы наиболее показательные факты, характеризующие специфику анализа нуклеотид-

ных полиморфизмов в ДНК с использованием ДНК-лигаз и ДНК-полимераз. Представленные данные отражают фундаментальные принципы обеспечения селективности превращений олигонуклеотидных зондов при анализе ДНК с помощью данных ферментов и указывают на наиболее перспективные разработки в этом направлении, имеющиеся к настоящему моменту. Проведенный анализ показывает, что, несмотря на значительное число работ, рассмотренных в данном обзоре, проблема обеспечения селективности превращения зондов в ходе ферментативных реакций является недостаточно изученной и необходимость ее дальнейшего исследования представляется неоспоримой. ●

*Авторы выражают благодарность Пышной И.А. за помощь при подготовке обзора.  
Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», СО РАН (интеграционные гранты № 76 и 39) и РФФИ (гранты № 08-04-12041, 10-04-01492-а).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rocha D., Gut I., Jeffreys A.J., et al. // Hum. Genet. 2006. V. 119. № 4. P. 451–456.
- Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., et al. // Nucleic Acids Res. 1989. V. 17. № 7. P. 2503–2516.
- Huang M.M., Arnheim N., Goodman M.F. // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20. № 17. P. 4567–4573.
- Wu D.Y., Wallace R.B. // Genomics. 1989. V. 4. № 4. P. 560–569.
- Barany F. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1991. V. 88. № 1. P. 189–193.
- Liu Q., Thorland E.C., Heit J.A., Sommer S.S. // Genome Res. 1997. V. 7. № 4. P. 389–398.
- Chen X., Zehnbauser B., Gnirke A., Kwok P.Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997. V. 94. № 20. P. 10756–10761.
- Hu Y.W., Balaskas E., Kessler G., et al. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. № 21. P. 5013–5015.
- Пышный Д.В., Скобельцына Л.М., Гущина Е.Н. и др. // Молекуляр. биология. 2000. Т. 34. № 6. С. 984–997.
- Deng J.Y., Zhang X.E., Mang Y., et al. // Biosens. Bioelectron. 2004. V. 19. № 10. P. 1277–1283.
- Virigoswami A., Jung C., Mun H.Y., Park H.G. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2008. V. 70. № 6. P. 897–902.
- Abravaya K., Carrino J.J., Muldoon S., Lee H.H. // Nucleic Acids Res. 1995. V. 23. № 4. P. 675–682.
- Пышная И.А., Виноградова О.А., Кабилов М.Р., Иванова Е.М., Пышный Д.В. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 9. С. 1238–1251.
- Kwok S., Kellogg D.E., McKinney N., et al. // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18. № 4. P. 999–1005.
- Ayyadevara S., Thaden A.A., Reis R.J.S. // Anal. Biochem. 2000. V. 284. № 1. P. 11–18.
- Thweatt R., Goldstein S., Reis R.J.S. // Anal. Biochem. 1990. V. 190. № 2. P. 314–316.
- Suss B., Flekna G., Wagner M., Hein I. // J. Microbiol. Methods. 2009. V. 76. № 3. P. 316–319.
- Liang P., Pardee B.A. // Science. 1992. V. 257. № 5072. P. 967–971.
- Christopherson C., Sninsky J., Kwok S. // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. № 3. P. 654–658.
- Bru D., Martin-Laurent F., Philippot L. // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. № 5. P. 1660–1663.
- Day J.P., Bergstrom D., Hammer R.P., Barany F. // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. № 8. P. 1810–1818.
- Petruska J., Goodman M.F., Boosalis M.S., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1988. V. 85. № 17. P. 6252–6256.
- Mendelman L.V., Petruska J., Goodman M.F. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 4. P. 2338–2346.
- Tong J., Cao W., Barany F. // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. № 3. P. 788–794.
- Pritchard C.E., Southern E.M. // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. № 17. P. 3403–3407.
- Housby J.N., Southern E.M. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. № 18. P. 4259–4266.
- James K.D., Boles A.R., Henckel D., Ellington A.D. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. № 22. P. 5203–5211.
- Harada K., Orgel L. // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21. № 10. P. 2287–2291.
- Sriskanda V., Shuman S. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. № 15. P. 3536–3541.
- Luo J., Bergstrom D.E., Barany F. // Nucleic Acids Res. 1996. V. 24. № 14. P. 3071–3078.
- Nakatani M., Ezaki S., Atomi H., Imanaka T. // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. № 2. P. 650–656.
- Wu D.Y., Wallace R.B. // Gene. 1989. V. 76. № 2. P. 245–254.
- Bhagwat A.S., Sanderson R.J., Lindahl T.S. // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. № 27. P. 4028–4033.
- Shuman S. // Biochemistry. 1995. V. 34. № 49. P. 16138–16147.
- Lamarche B.J., Showalter A.K., Tsai M.D. // Biochemistry. 2005. V. 44. № 23. P. 8408–8417.
- Alexander R.C., Johnson A.K., Thorpe J.A., Gevedon T., Testa S.M. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. № 12. P. 3208–3216.
- Aoi Y., Yoshinobu T., Tanizawa K., Kinoshita K., Iwasaki H. // BioSystems. 1999. V. 52. № 1–3. P. 181–187.
- Steitz T.A. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1993. V. 3. № 1. P. 31–38.
- Delarue M., Poch O., Tordo N., Moras D., Argos P. // Protein Eng. 1990. V. 3. № 6. P. 461–467.
- Loh E., Loeb L.A. // DNA Repair. 2005. V. 4. № 12. P. 1390–1398.
- Kim Y., Eom S.H., Wang J., et al. // Nature. V. 376. № 6541. P. 612–616.
- Strerath M., Gloeckner C., Liu D., Schnur A., Marx A. // ChemBiochem. 2007. V. 8. № 4. P. 395–401.
- Subramanya H.S., Doherty A.J., Ashford S.R., Wigley D.B. // Cell. 1996. V. 85. № 4. P. 607–615.
- Doherty A.J., Suh S.W. // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. № 21. P. 4051–4058.
- Shuman S. // Structure. 1996. V. 4. № 6. P. 653–656.
- Martin I.A., MacNeill S.A. // Genome Biol. 2002. V. 3. № 4. P. 1–7.
- Pascal J.M., O'Brien P.J., Tomkinson A.E., Ellenberger T. // Nature. 2004. V. 432. № 7016. P. 473–478.
- Cherepanov A.V., de Vries S. // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. № 24. P. 5993–5999.
- Doublet S., Tabor S., Long A.M., Richardson C.C., Ellenberger T. // Nature. 1998. V. 391. № 6664. P. 251–258.
- Franklin M.C., Wang J., Steitz T.A. // Cell. 2001. V. 105. № 5. P. 657–667.
- Li Y., Korolev S., Waksman G. // EMBO J. 1998. V. 17. № 24. P. 7514–7525.
- Kiefer J.R., Mao C., Braman J.C., Beese L.S. // Nature. 1998. V. 391. № 6664. P. 304–307.
- Drew H.R., Wing R.M., Takano T., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1981. V. 78. № 4. P. 2179–2183.
- Odell M., Sriskanda V., Shuman S., Nikolov D.B. // Mol. Cell. 2000. V. 6. № 5. P. 1183–1193.
- Johnson A., O'Donnell M. // Curr. Biol. 2005. V. 15. № 3. P. R90–R92.
- Nandakumar J., Nair P.A., Shuman S. // Mol. Cell. 2007. V. 26. № 2. P. 257–271.
- Nair P.A., Nandakumar J., Smith P., et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2007. V. 14. № 8. P. 770–778.
- Lu X.J., Shakked Z., Olson W.K. // J. Mol. Biol. 2000. V. 300. № 4. P. 819–840.
- Seeman N.C., Rosenberg J.M., Rich A. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1976. V. 73. № 3. P. 804–808.
- Kunkel T.A., Bebenek K. // Annu. Rev. Biochem. 2000. V. 69. P. 497–529.
- Eom S.H., Wang J., Steitz T.A. // Nature. 1996. V. 382. P. 278–281.
- Hendrickson C.L., Devine K.G., Benner S.A. // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. № 7. P. 2241–2250.
- Polesky A.H., Steitz T.A., Grindley N.D.F., Joyce C.M. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 24. P. 14579–14591.
- Polesky A.H., Dahlberg M.E., Benkovic S.J., Grindley N.D.F., Joyce C.M. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 12. P. 8417–8428.
- Braithwaite D.K., Ito J. // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21. № 4. P. 787–802.



66. Doherty A.J., Dafforn T.R. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 296. № 1. P. 43–56.
67. Odell M., Shuman S. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 20. P. 14032–14039.
68. Ng P., Bergstrom D.E. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. № 13. P. e107.
69. Wang L.K., Nair P.A., Shuman S. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 34. P. 23343–23352.
70. Wang L.K., Zhu H., Shuman S. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 13. P. 8486–8494.
71. Doherty A.J., Serpell L.C., Ponting C.P. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. № 13. P. 2488–2497.
72. Shao X., Grishin N.V. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. № 14. P. 2643–2650.
73. Liu P., Burdzy A., Sowers L.C. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. № 15. P. 4503–4511.
74. Perrino F.W., Preston B.D., Sandell L.L., Loeb L.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989. V. 86. № 21. P. 8343–8347.
75. McCain M.D., Meyer A.S., Schultz S.S., Glekas A., Spratt T.E. // *Biochemistry.* 2005. V. 44. № 15. P. 5647–5659.
76. Spratt T.E. // *Biochemistry.* 2001. V. 40. № 9. P. 2647–2652.
77. Morales J.C., Kool E.T. // *Biochemistry.* 2000. V. 39. № 42. P. 12979–12988.
78. Thompson E.H., Bailey M.F., van der Schans E.J., Joyce C.M., Millar D.P. // *Biochemistry.* 2002. V. 41. № 3. P. 713–722.
79. Minnick D.T., Bebenek K., Osheroff W.P., et al. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 5. P. 3067–3075.
80. Summerer D., Rudinger N.Z., Detmer I., Marx A. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2005. V. 44. № 30. P. 4712–4715.
81. Feng H. // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2007. V. 39. № 8. P. 608–616.
82. Feng H., Parker J.M., Lu J., Cao W. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. № 39. P. 12648–12659.
83. Broude N.E., Sano T., Smith C.L., Cantor C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994. V. 91. P. 3072–3076.
84. Dubiley S., Kirillov E., Lysov Yu., Mirzabekov A. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. № 12. P. 2259–2265.
85. Пышный Д.В., Кривенко А.А., Лохов С.Г. и др. // *Биоорганическая химия.* 1998. Т. 24. № 1. С. 32–37.
86. Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., et al. // *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17. № 7. P. 2503–2516.
87. Cha R.S., Zarbl H., Keohavong P., Thilly W.G. // *PCR Methods Appl.* 1992. V. 2. № 1. P. 14–20.
88. Rust S., Funke H., Assmann G. // *Nucleic Acids Res.* 1993. V. 21. № 16. P. 3623–3629.
89. Зыкова Е.С., Патрушев Л.И., Каюшин А.И. и др. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. № 3. С. 205–210.
90. Zhou G.H., Kamahori M., Okano K., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. № 19. P. e93.
91. Nielsen P.E. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001. V. 12. № 1. P. 16–20.
92. Koshkin A.A., Singh S.K., Nielsen P., et al. // *Tetrahedron.* 1998. V. 54. № 14. P. 3607–3630.
93. Orum H., Jakobsen M.H., Koch T., Vuust J., Borre M.B. // *Clin. Chem.* 1999. V. 45. № 11. P. 1898–1905.
94. Nguyen H.K., Fournier O., Asseline U., Dupret D., Thuong N.T. // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. № 6. P. 1492–1498.
95. Hacia J.G., Woski S.A., Fidanza J., et al. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. № 21. P. 4975–4982.
96. Guo Z., Liu Q., Smith L.M. // *Nat. Biotechnol.* 1997. V. 15. № 4. P. 331–335.
97. Zirvi M., Bergstrom D.E., Saurage A.S., Hammer R.P., Barany F. // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. № 24. P. e41.
98. Latorra D., Campbell K., Wolter A., Hurley J.M. // *Hum. Mutat.* 2003. V. 22. № 1. P. 79–85.
99. Giusto D.A.D., King G.C. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. № 3. P. e32.
100. Kennedy B., Arar K., Reja V., Henry R.J. // *Anal. Biochem.* 2006. V. 348. № 2. P. 294–299.
101. Ballantyne K.N., van Oorschot R.A.H., Mitchell R.J. // *Genomics.* 2008. V. 91. № 3. P. 301–305.
102. Strand H., Ingebretsen O.C., Nilssen O. // *Clin. Chim. Acta.* 2008. V. 390. № 1–2. P. 126–133.
103. Koizumi M., Morita K., Takagi M., Yasumo H., Kasuya A. // *Anal. Biochem.* 2005. V. 340. № 2. P. 287–294.
104. Petersen M., Nielsen C.B., Nielsen K.E., et al. // *J. Mol. Recognit.* 2000. V. 13. № 1. P. 44–53.
105. Summerer D., Marx A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. № 6. P. 910–911.
106. Tews B., Wilhelm J., Summerer D., et al. // *Biol. Chem.* 2003. V. 384. № 10–11. P. 1533–1541.
107. Strerath M., Gaster J., Marx A. // *Chembiochem.* 2004. V. 5. № 11. P. 1585–1588.
108. Strerath M., Gaster J., Summerer D., Marx A. // *Chembiochem.* 2004. V. 5. № 3. P. 333–339.
109. Kranaster R., Marx A. // *Chemistry.* 2007. V. 13. № 21. P. 6115–6122.
110. Zhang J., Li K. // *Mol. Biotechnol.* 2003. V. 25. № 3. P. 223–227.
111. Yanga H.L., Jiang H.J., Fang W.Y., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 328. № 1. P. 265–272.
112. Hu Y.J., Li Z.F., Diamond A.M. // *Anal. Biochem.* 2007. V. 369. № 1. P. 54–59.
113. Пышный Д.В., Иванова Е.М., Пышная И.А., Зарыгова В.Ф. Патент РФ № 2259402 от 27.08.2005.

УДК 571.27

# Регуляция процессинга иммуногена: сигнальные последовательности и их использование для создания нового поколения ДНК-вакцин

Е.С. Стародубова<sup>1\*</sup>, М.Г. Исагулянц<sup>2,3,\*</sup>, В.Л. Карпов<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

<sup>3</sup> Institute of Microbiology, Cell and Tumor Biology, Karolinska Institutet, 17177, Stockholm, Sweden

\* E-mail: estarodubova@yandex.ru, maria.isaguliantz@smi.se

**РЕФЕРАТ** Среди новых направлений в создании профилактических и терапевтических вакцин против различных патогенов весьма перспективным считается использование ДНК-вакцин. Активно разрабатывается целый ряд ДНК-вакцинных препаратов, часть из которых уже проходят клинические испытания. Тем не менее иммуногенность ДНК-вакцин, особенно для человека, еще недостаточно высока. Для повышения их эффективности используются различные подходы. Одним из таких подходов является модификация иммуногена, изменяющая путь их процессинга и презентации, что в свою очередь изменяет иммунный ответ на иммуноген. Такая модификация основана на конструировании эукариотических экспрессионных векторов, кодирующих химерные белки, состоящие из антигена и специализированных сигнальных последовательностей. В обзоре рассмотрены различные сигналы, направляющие несущий их белок в определенные компартменты клетки, а также примеры их использования для создания ДНК-иммуногенов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ДНК-вакцины, МНС-I, МНС-II, презентация антигена.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** эндоплазматический ретикулум (ER), убиквитин (Ub), вирус гепатита С человека (HCV), орнитиндекарбоксилаза (ODC), обратная транскриптаза HIV-1 (RT), Ca<sup>2+</sup>-связывающий белок калретикулин (CRT), вирус папилломы человека-16 (HPV-16), лизосомаассоциированный белок 1 (LAMP-1), нуклеокапсидный белок коронавируса SARS (sarsN), вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), главный комплекс гистосовместимости класса I (МНС-I), главный комплекс гистосовместимости класса II (МНС-II).

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно развиваются вакцины, создаваемые генно-инженерными методами. Среди них весьма перспективными считаются ДНК-вакцины. В самом простом варианте ДНК-вакцина представляет собой плазмиду, содержащую ген белка патогена и элементы, необходимые для транскрипции этого гена в клетках млекопитающих. При иммунизации ДНК попадает в клетки организма, транскрибируется и происходит синтез закодированного антигена, который, в свою очередь, инициирует иммунный ответ (рис. 1). В отличие от белковых вакцин ДНК-вакцины на основе генов вирусов и раковых антигенов имеют то преимущество, что специфический иммуноген синтезируется непосредственно в организме хозяина и правильно процессируется, что в итоге индуцирует иммунный ответ желаемой специфичности. Также эта технология является перспективной за счет дешевизны и простоты производства и транспортировки препаратов, по сравнению с традиционными вакцинами. Кроме того, ДНК-иммуноген относи-

тельно просто может быть изменен методами генной инженерии, что дает возможность создания антигена с новыми свойствами, сконструированными *in silico*. При использовании ДНК-вакцин могут возникать опасения относительно возможности встраивания вносимого генетического материала в геном хозяина (инсерционного мутагенеза). Однако вероятность такого события чрезвычайно низка. Она составляет от 1–7 событий на 150 000 ядер, что на три порядка меньше, чем частота естественных спонтанных мутаций в организме [1].

ДНК-вакцины применяются для индукции протективного иммунного ответа против различных инфекций как на мелких животных, например грызунах, так и на животных более крупных видов [2–4]. Проводятся серии испытаний профилактических и терапевтических ДНК-вакцин против патогенов человека, таких как HIV-1 и HCV [5–7]. Однако иммуногенность генетических вакцин требует улучшения, в особенности для применения на людях [8–10]. Для увеличения эффективности ДНК-вакцин ис-

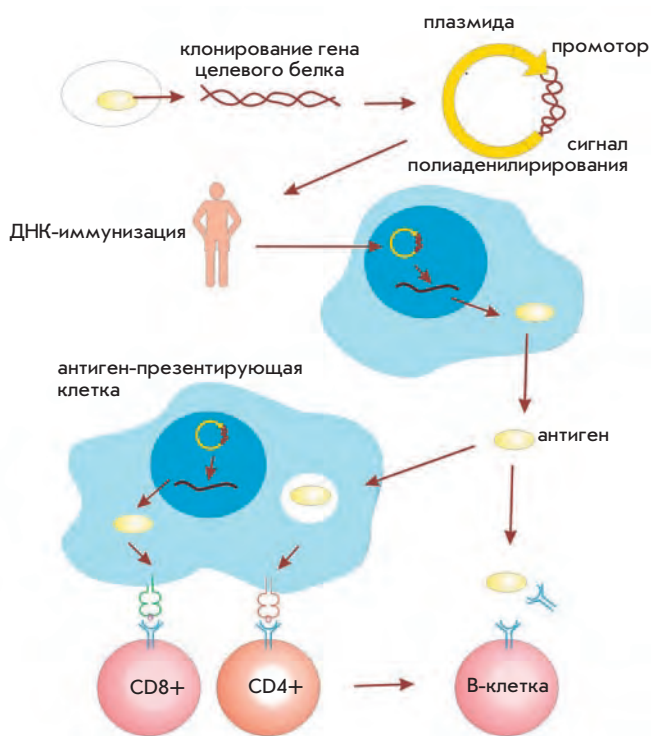


Рис. 1. ДНК-иммунизация

пользуют различные подходы [11–13]. Они включают в себя разработку новых методов доставки ДНК-вакцин (особо популярной в последнее время стала электропорация), добавление в состав препаратов цитокинов и химокинов [14], оптимизируют основу векторной молекулы: подбирают эффективные промоторы генов и регуляторные элементы плазмиды [15], регулируют CpG состав молекулы [14]. Сам ДНК-антиген также подвергается модификации, в частности осуществляют оптимизацию последовательностей генов целевых белков для улучшения их экспрессии [16]. Одним из перспективных подходов модификации иммуногена является изменение природного пути его процессинга и презентации [17]. Такое перенаправление может быть достигнуто за счет добавления специализированных сигнальных последовательностей белков. В данном обзоре рассматриваются сигналы направления белков в различные клеточные компартменты и их применение для конструирования ДНК-вакцин.

Для узнавания иммунной системой антиген должен быть процессирован и представлен на поверхности клетки мо-

лекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Различают два наиболее значимых класса этих молекул: МНС класса I (МНС-I) и МНС класса II (МНС-II). Для связывания с молекулами каждого класса антиген проходит подготовку в специализированных компартментах клетки (табл. 1). Так, эндогенные белки направляются на деградацию на протеасоме и представляются в комплексе с МНС-I на поверхности клетки для распознавания рецепторами цитотоксических CD8+ Т-клеток (CTL), которые осуществляют цитотоксический иммунный ответ [18]. Экзогенный белок расщепляется лизосомными протеазами, включается в состав МНС-II молекул и распознается рецепторами хелперных CD4+ Т-клеток, которые способствуют как клеточному, так и гуморальному ответам [19]. Таким образом, путь процессинга антигена определяет тип иммунного ответа на него.

### ПРЕЗЕНТАЦИЯ ДНК-КОДИРУЕМОГО АНТИГЕНА ПО ПУТИ МНС-I

Как уже было сказано, процессинг антигена по пути МНС-I приводит к развитию CTL-ответа. Этот процесс проходит в несколько этапов (рис. 2). Белок, синтезированный в клетке, расщепляется протеасомой на короткие пептиды, которые переносятся белками-транспортерами, ассоциированными с процессингом антигенов (ТАР), в эндоплазматический ретикулум (ER), где они связываются с МНС-I [18]. Затем комплекс пептид-МНС-I транспортируется на поверхность клетки для распознавания рецепторами цитотоксических CD8+ Т-клеток (CTL), которые осуществляют клеточный ответ. Поэтому усиление направления белков в протеасому или ER должно способствовать их большей доступности для представления по МНС-I пути и, следовательно, усилению клеточного ответа.

### ПРОТЕАСОМ-ОПОСРЕДОВАННЫЙ МЕХАНИЗМ

Для деградации на протеасоме белок должен нести специальную метку – цепь молекул убиквитина (Ub), который представляет собой небольшой полипептид, состоящий из 76 аминокислотных остатков. В эукариотической клетке существует специализированный комплекс ферментов, осуществляющих узнавание белковых субстратов и ковалентное присоединение к ним полиубиквитина, – убиквитин-конъюгирующая система [20]. Распознаваемые этой системой сигналы направления на деградацию в протеасому разнообразны. Такими деградационными сигналами могут служить аминокислотные последовательности, определенный характер фосфорилирования белка, а также изменения пространственной укладки его молекулы. Идентифицировано несколько деградационных сигналов с характерной аминокислотной последователь-

Таблица 1. Пути процессинга антигенов и формы иммунного ответа

Локализация антигена	Основной инструмент процессинга	Антиген-презентирующий комплекс	Узнающие клетки иммунной системы	Стимулируемый иммунный ответ
Внутри клетки	Протеасома	МНС-I	CD8+	Цитотоксический
Вне клетки	Лизосома	МНС-II	CD4+	Клеточный, гуморальный

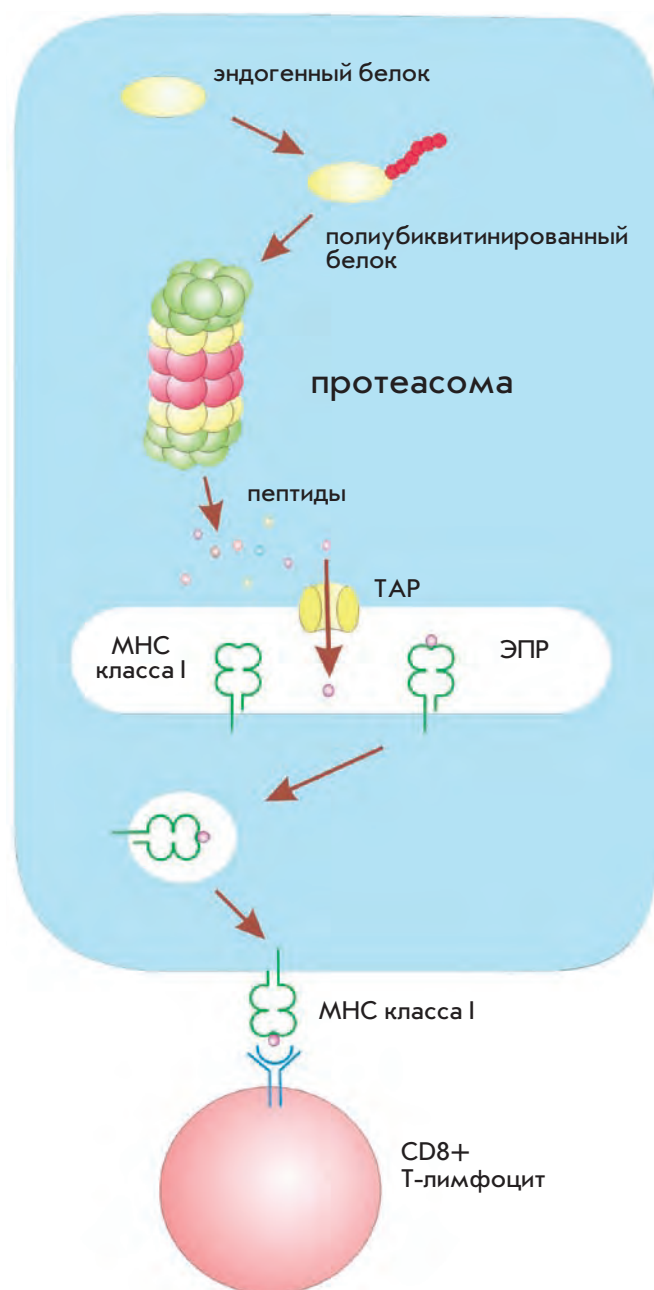


Рис. 2. Процессинг антигена при презентации в комплексе с MHC-I

ностью. Первым выявленным сигналом, который регулирует накопление белка в клетке, является N-дегрон [21]. Он представлен N-концевой аминокислотой белка, которая является субстратом действия специализированных клеточных ферментов. Также установлены сигналы деградации: PEST-последовательность [22] и Destruction Box [23], которые характерны для короткоживущих клеточных белков (табл. 2).

### УБИКВИТИН-ЗАВИСИМЫЙ МЕХАНИЗМ

Серьезное внимание исследователей было сфокусировано на направлении антигена на деградацию на протеасоме по убиквитин-зависимому механизму, которое позволило

изменить процессинг и презентацию антигена в составе MHC-I и усилить CTL-ответ [25–28]. Такое направление осуществляли путем клонирования Ub-кодирующей последовательности на 5'-конец целевого гена в сочетании с введением после Ub дестабилизирующего N-концевого остатка, что делало антиген еще более подходящим субстратом для протеасомы. В данной конструкции Ub посттрансляционно отщепляется клеточной C-концевой убиквитин-гидролазой и открывается доступ к N-дегрону. С использованием этого подхода был модифицирован ген белка nef HIV-1 (Ub-Arg-Nef), что привело к его более высокой иммуногенности в экспериментах на мышах [29]. Слияние с убиквитином было использовано при иммунизации экспрессионными библиотеками генов HIV-1. Во все открытые рамки считывания HIV-1, закодированные на 32 плаزمидях, была добавлена кодирующая последовательность убиквитина. После однократной иммунизации генной пушкой такая библиотека стимулировала сильный T-клеточный ответ против всех 32 антигенов. Ответ детектировали по CTL-активности, IFN- $\gamma$ /CD8+ T-клеточной активации и связыванию тетрамеров HLA [30]. Добавление убиквитина на N-конец синтетического белка, состоящего из CTL-эпитопов HIV, также привело к усилению иммуногенности конструкта на клеточном уровне [31].

Сигналом протеасомной деградации может служить также неправильная укладка белка. Этот вариант был применен к белкам вируса гриппа. Были сконструированы нестабильные варианты белков M1 и NS1, в которых трехмерная структура белков была разрушена введением коротких последовательностей в альфа-спиральные участки. Иммунизация генами «деструктурированных» белков приводила к значительно более сильному CTL-ответу, чем иммунизация исходными генами [32].

Однако на некоторых вирусных белках слияние с протеасом-направляющими сигналами не привело к ускорению их деградации [27, 33]. Белок HIV-1 Gag, модифицированный убиквитином и дестабилизирующим остатком аргинина (Ub-Arg-Gag), лишь незначительно изменил скорость деградации. Для значительной дестабилизации белка потребовалось введение дополнительной последовательности, содержащей экспонированный остаток лизина  $e^k$  (Ub-R- $e^k$ -Gag). Химера Ub-R- $e^k$ -Gag активно направлялась в протеасому, что повысило презентацию антигенных пептидов в комплексе с MHC-I на поверхности клеток, однако это не привело к значительному усилению анти-Gag CTL-ответа при иммунизации мышей [34]. Аналогичный результат был получен для нескольких химер белка нуклеокапсида вируса гепатита человека (HCV), которые содержали как ковалентно связанный убиквитин, так и отщепляемый Ub в сочетании с N-стабилизирующим или N-дестабилизирующим аминокислотным остатком [35]. В ряде других случаев, особенно на вирусных моделях, усиление протеасомной деградации также не привело к повышению протективного иммунитета [34].

### УБИКВИТИН-НЕЗАВИСИМЫЙ МЕХАНИЗМ

Интересно отметить, что для деградации некоторых белков не требуется убиквитинирование [36]. Первым найденным белком такого типа была орнитиндекарбоксилаза (ODC) [37]. Ее деградация зависит от АТФ и белка-антизима.



С-конец антизима осуществляет связывание с N-концевой частью орнитиндекарбоксилазы, при этом ODC направляется в протеасому, а сам антизим высвобождается. Помимо сайта связывания антизима, находящегося на N-конце ODC, в С-концевой части находится PEST-сигнал [38]. В экспериментах на делеционных мутантах ODC было установлено, что минимальным необходимым сигналом для быстрой деградации ODC на протеасоме являются 37 концевых аминокислот [39]. Показано, что этот участок отвечает за связывание ODC с протеасомой. Убиквитин-конъюгирующая система является многоступенчатым, сложно регулируемым механизмом. Использование сигналов деградации белков, направляемых в протеасому по убиквитин-независимому механизму, позволяет избежать влияния на эффективность направления в протеасому большого числа факторов. Слияние обратной транскриптазы HIV-1 с двумя короткими сигналами, содержащимися на С-конце ODC и представляющими собой минимальный протеасом-направляющий мотив, приводит к ускорению деградации и улучшению иммунного ответа у мышей по сравнению с исходным немодифицированным геном [40]. Эта модификация успешно сработала для низкоиммуногенной [41] лекарственно-устойчивой обратной транскриптазы HIV-1 и позволила индуцировать как клеточный, так и антительный иммунный ответ [42].

### ER-ОПОСРЕДОВАННЫЙ МЕХАНИЗМ

При процессинге по МНС-I-пути антиген проходит ER. Поэтому повышение сродства антигена к ER может улучшить иммуногенные свойства антигена. В ER широко представлен  $Ca^{2+}$ -связывающий белок калретикулин (CRT) [43], который ассоциирован с компонентами, осуществляющими представление антигена по МНС-I-пути [44, 45]. Присоединение калретикулина к кодируемому антигену было использовано для усиления Т-клеточного иммунного ответа на опухолевые клетки. Была создана ДНК-вакцина, кодирующая химеру CRT с белком E7 вируса папилломы человека-16 (HPV-16) E7. У мышей, иммунизированных этим препаратом, наблюдалось значительное увеличение популяции E7-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток и их литическая активность в отношении E7-экспрессирующих опухолей [46, 47]. Слияние CRT с другим белком HPV-16 – E6 также привело к усилению E6-специфического CD8<sup>+</sup> Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей [48].

Изменение локализации белка E7 HPV-16, связанное с повышением его ассоциации с ER, было достигнуто и другим путем при его слиянии с внеклеточным доменом лиганда Fms-подобной тирозинкиназы 3 (FL) [49]. Данный ДНК-иммуноген, введенный подкожно с помощью генной пушки, значительно повышал частоту активации E7-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток по сравнению с вакциной, несущей немодифицированный вариант гена E7. В ходе *in vitro* исследований было выявлено, что клетки линии 293, трансфицированные FL-E7 ДНК, представляют E7 антиген в составе МНС-I более эффективно, чем при трансфекции ДНК исходным геном E7. Химера FL-E7 активировала в основном CD8<sup>+</sup> Т-клетки, и противоопухолевый эффект был полностью независимым от CD4<sup>+</sup> Т-клеток [49].

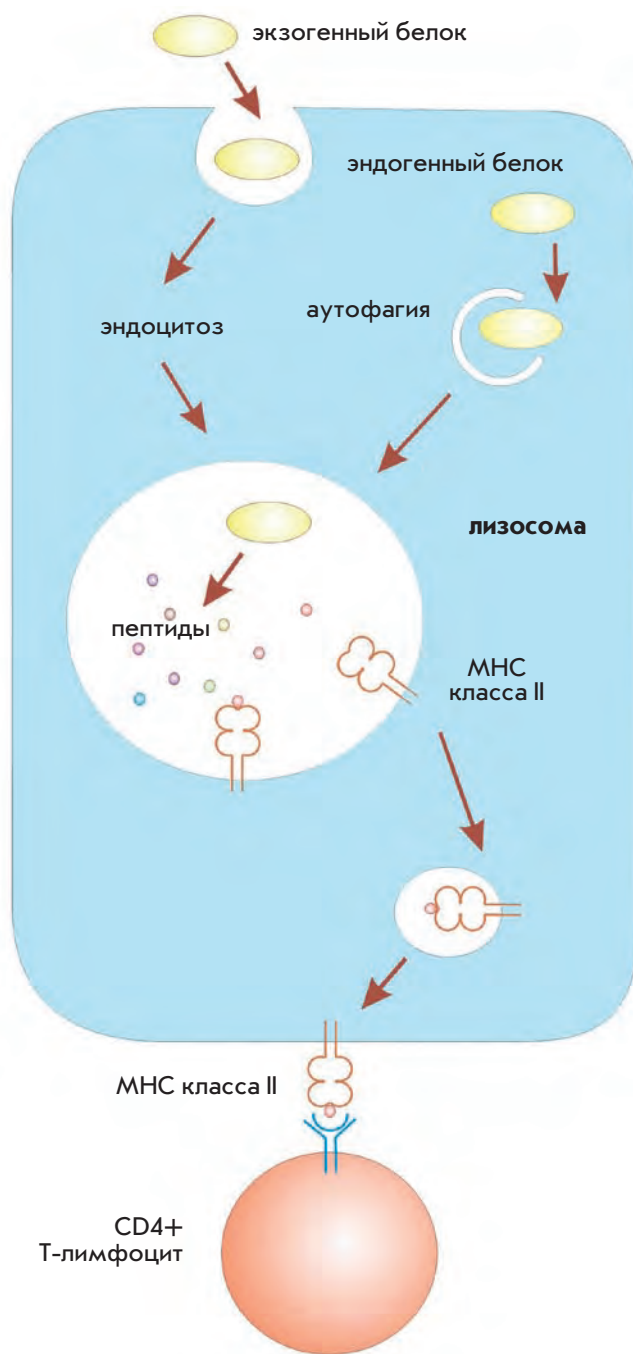


Рис. 3. Процессинг антигена при презентации в комплексе с МНС-II

Успешный опыт по усилению иммунного ответа к оболочечному белку E2 HCV был получен при удвоении сигнала локализации в ER, что привело к облегчению освобождения E2 из эндоплазматического ретикулума [50].

### ПРЕЗЕНТАЦИЯ ДНК-КОДИРУЕМОГО АНТИГЕНА ПО ПУТИ МНС-II

Основным источником пептидов для связывания с МНС-II являются экзогенные белки, которые с помощью эндо-

Таблица 2. Сигналы деградации на протеасоме со специфическими аминокислотными последовательностями

Название сигнала	Аминокислотная последовательность
N-дегрон	N-концевая кислота (узнающий фермент): Дестабилизирующие – F, L, W, Y, I, R, K, H, A, S, T, G (E3 -лигаза); N,Q (N-концевая аминогидролаза); D,E,C (Arg-т-РНК-трансфераза) Стабилизирующие – M, S, G, V (нет распознающих ферментов)
PEST-последовательность	Последовательность, обогащенная пролином (P), глутаминовой кислотой (E), серином (S) и треонином (T)
Destruction box	R-A/T-A-L-G-X-I/V-G/T-N

цитоза и далее направляются в лизосомы (рис. 3). Однако обнаружено, что пептиды некоторых внутриклеточных белков также могут быть представлены МНС-II посредством аутофагии [51]. При этом белки попадают в лизосомы при шаперон-опосредованном переносе из цитоплазмы белком-транспортёром, при окружении части цитоплазмы мембраной лизосом, а также при формировании двумембранных аутофогосом в цитоплазме [51–55][49–53]. В лизосомах антиген расщепляется кислыми протеазами, и образованные пептиды включаются в состав МНС-II-молекул. На поверхности клеток эти комплексы распознаются рецепторами CD4+ Т-клеток [56]. В результате происходит активация CD4+ Т-клеток, которые стимулируют как клеточный иммунитет (Th1-тип CD4+ Т-клеток), так и гуморальный иммунитет (Th2-тип).

Традиционно терапевтические стратегии вакцинации растворимыми белковыми антигенами нацелены на мобилизацию CD4+ Т-клеток. Сравнительно низкий ответ CD4+ Т-клеток является одним из недостатков ДНК-вакцин. Текущие клинические испытания также показали, что нынешнее поколение ДНК-вакцин не способно индуцировать выработку высоких титров антител [57]. Поэтому направление антигенов по пути презентации МНС-II с целью повышения способности активировать CD4+ Т-клетки представляется особо выигрышным. Такое направление может задаваться искусственно путем добавления к ДНК-антигену сигналов лизосомной локализации.

Иммуноген, кодируемый ДНК, может быть специфически перенаправлен в лизосомы клетки с помощью сигналов белкового сортинга. Внутриклеточные сигналы сортинга содержатся в цитоплазматических концевых фрагментах трансмембранных и лизосомаассоциированных белков [24, 58, 59]. Большинство из них представляет собой короткие аминокислотные последовательности, которые можно подразделить на тирозин- и дилейцинсодержащие [24, 60]. Тирозинсодержащие сигналы представляют собой консенсусный мотив: NPXY или YXXØ (где X – любая аминокислота, а Ø – аминокислота с объемной гидрофобной боковой цепью). Консенсусная последовательность дилейциновых сигналов: (DE)XXXL(LI) или DXHLL. Эти сигналы распознаются адапторным белком AP или родственными комплексами и затем направляются в транс-Гольджи, плазматическую мембрану или эндосомы. Существуют и другие мотивы, напри-

мер кластер кислых аминокислот и последовательность NPFSD [58]. Ряд клеточных белков направляется в лизосомы за счет наличия фосфорилированного остатка маннозы, находящегося на консенсусной последовательности NX(ST) [61–63]. Предполагается также наличие сигналов направления цитоплазматических белков в лизосому по аутофагосомному механизму [64].

### ЛИЗОСОМ-ОПОСРЕДОВАННЫЙ МЕХАНИЗМ

Показано, что тирозин- и дилейцинсодержащие сигналы способны эффективно направлять в лизосому гетерологичные белки [19, 65, 66]. Наиболее активно применялось направление на презентацию по МНС-II-пути с помощью сигналов сортинга белков LAMP-1 [67], Ii [65] и AP3-связывающего мотива LIMP II [66].

### СИГНАЛ LAMP-1

Сигнал сортинга лизосомаассоциированного белка 1 (LAMP-1) направляет антиген по пути процессинга МНС-II и усиливает его презентацию CD4+ Т-клеткам, что показано в опытах *in vitro*. Эксперименты по иммунизации мышей продемонстрировали, что химеры с геном LAMP-1 стимулируют повышение лимфопролиферативной активности, титров антител и СТЛ-активности по сравнению с ДНК-вакцинами на основе немодифицированных вариантов генов.

Усиление Th2-типа иммунного ответа CD4+ Т-клеток при слиянии с белком LAMP-1 было продемонстрировано для ДНК-иммуногенов на основе генов белков HIV-1 gp160- и p55gag [68, 69]. LAMP/gag DNA-вакцина стимулировала длительный В-, CD4+ и CD8+ Т-клеточные ответы, тогда как иммунный ответ на введение ДНК немодифицированного гена Gag быстро спадал [70]. Другой пример успешного перенаправления цитоплазматического белка – нуклеокапсидный белок коронавируса SARS (sarsN). Был проанализирован спектр иммунного ответа у мышей в ответ на введение ДНК, кодирующей химеру sarsN с LAMP-1. Иммунизация LAMP-sarsN геном индуцировала сбалансированный IFN-γ и IL-4-ответ, а также сильную активацию СТЛ-ответа [66]. Слияние LAMP-1 с обратной транскриптазой HIV-1 привело к улучшению иммуногенности прототипной ДНК-вакцины против лекарственно-устойчивого вируса. Была преодолена толерантность иммунной системы к консервативному ретровирусному

антигену и достигнут сильный иммунный ответ смешанного Th1/Th2-типа против обратной транскриптазы как дикого, так и лекарственно-устойчивого типов [71].

Слияние с LAMP-1 способствовало также повышению иммуногенности белка оболочки флави вируса. В кандидатной вакцине против вируса Дэнге типа 2 на основе генов премембранного белка (prM) и белка оболочки (E) трансмембранные и цитоплазматический домены белка E были заменены аналогичными доменами белка LAMP-1 [72]. Для полученного химерного белка было показано специфическое гранулярное цитоплазматическое окрашивание, свидетельствующее о ко-локализации химеры с эндогенными белками LAMP-1, МНС-II, и H2-M, чего не наблюдали в случае немодифицированного антигена. Мыши, иммунизированные модифицированным конструктором Dengi PrM/E, отвечали значительно более высоким уровнем продукции нейтрализующих антител по сравнению с мышами, иммунизированными немодифицированным вариантом. Аналогично, для вируса Западного Нила последовательность гена премембранного и оболочечного белков (preM-E) была слита с трансмембранным и цитоплазматическим доменами LAMP [73]. В мышах, иммунизированных ДНК-конструктором, экспрессирующим химеру WN preM-E/LAMP, наблюдалась значительная выработка антител с длительной нейтрализующей активностью в отличие от иммунизации плазмидами с исходным вариантом антигена, приводящей к образованию короткоживущих антител в низком титре. Эти результаты могут стать основой для создания эффективной ДНК-вакцины против флавириусов.

Введение гена белка E7 HPV-16, слитого с LAMP, также позволило усилить Th2-тип иммунного ответа [74]. Введение секреторного варианта ДНК-химеры E7-LAMP-1 в форме рекомбинантного вируса привело к выработке сильного противоопухолевого иммунитета, способного как предотвращать развитие опухолей, так и уменьшать уже имеющиеся [75].

Есть и несколько примеров неудачного применения данной модификации к цитоплазматическим белкам, например белку нуклеокапсида HCV и белку p53 [76]. Была создана плаزمид, экспрессирующая химеру белка нуклеокапсида HCV с сигнальной и С-концевой последовательностью LAMP-1. При иммунизации мышей не было зарегистрировано ни антительного ответа, ни пролиферации клеток, лишь очень слабая СТЛ-активность [35]. Таким образом, направление в лизосому не путем слияния иммуногена с LAMP не является гарантированно эффективным методом усиления иммунного ответа Th2-типа.

### СИГНАЛ ИНВАРИАНТНОЙ ЦЕПИ

Сами молекулы МНС класса II также нуждаются в транспортировке в лизосомный компартмент. За данный процесс ответственна инвариантная цепь молекул МНС класса II (Ii) [77]. Два сигнала сортировки содержатся в цитоплазматическом домене Ii [65, 77, 78].

Показано, что эндогенно синтезированные белки, обычно исключенные из представления по пути МНС-II, могут быть эффективно представлены молекулами МНС-II при слиянии с Ii [79]. Присоединение Ii к рекомбинантным антигенам может усилить, расширить и продлить протективный иммунный ответ на ДНК-вакцинные антигены, что проде-

монстрировано на животных моделях. Как было установлено в опытах *in vitro* и *in vivo*, иммуногены на основе аденовируса, экспрессирующие химеру Ii с гликопротеином вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), имеют повышенную способность стимулировать CD4+ и CD8+ Т-клетки. Кроме того, мыши, однократно вакцинированные данной плазмидой, оказываются защищенными от инфекции летальной дозой вируса хориоменингита [80]. Этот подход также эффективен при ДНК-иммунизации крупных животных. Так, был создан ДНК-конструкт на основе последовательности основного поверхностного белка 1a *Anaplasma marginale*, который был слит с мотивом бычьего Ii, направляющим его в лизосомы [81]. Однократное введение данной плазмиды эффективно стимулировало иммунный ответ, выраженный в активной пролиферации IFN- $\gamma$ + / CD4+ Т-клеток и продукции специфических иммуноглобулинов класса G. Однократное введение данной конструкции индуцировало образование иммунологической памяти, которая обеспечила ускоренный ответ при повторной встрече с антигеном [81].

### НАПРАВЛЕНИЕ В АУТОФАГОСОМЫ

На сегодняшний день точные механизмы аутофагии не установлены, ведется их активное изучение. Показано, что слияние с аутофагосом-ассоциированным белком Atg8/LC3 матриксного белка 1 вируса гриппа приводит к значительному усилению презентации в составе МНС-II и узнаванию CD4+ Т-клетками [82]. Это подтверждает, что аутофагия постоянно и эффективно доставляет цитоплазматические белки для представления МНС-II, что в свою очередь может быть использовано для улучшения стимуляции Т-хелперного ответа.

### НАПРАВЛЕНИЕ НА СЕКРЕЦИЮ

Эффективным методом индукции Т-хелперного иммунного ответа может быть нацеливание на выведение иммуногена во внеклеточную среду. Слияние белков HIV-1 Gag и Env с секреторным хемокином MCP3 направляет вирусные белки на секрецию и приводит к эффективной выработке антител у иммунизированных макаков. При заражении патогенным вирусом SIVmac251 у вакцинированных животных наблюдалось достоверно более низкое содержание вируса, чем у невакцинированных [83].

Эти результаты свидетельствуют, что направление антигена в лизосомы усиливает его представление в составе комплексов с МНС-II и позволяет существенно улучшить иммуногенность ДНК-вакцин.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время остро стоит вопрос создания вакцин против различных заболеваний человека, таких как иммунодефицит, вызываемый HIV-1, гепатит С, рак и др. ДНК-вакцинные технологии предоставляют большие возможности по конструированию эффективных специфических вакцинных препаратов. В данном обзоре мы рассмотрели ряд сигнальных последовательностей, которые вносятся в иммуногены для их направления по выбранному пути процессинга и презентации, как правило, отличающемуся от природного. Направление антигена на презентацию по МНС-I-пути с помощью различных механизмов



позволяет улучшить цитотоксический Т-клеточный ответ, а по МНС-II-пути – активировать Т-хелперы, которые в свою очередь способны стимулировать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В целом, использование сигнальных последовательностей как инструмента регуляции презентации иммуногена позволяет повысить иммуногенный потенциал существующих ДНК-вакцин и приближает к созданию эффективных профилактиче-

ских и терапевтических препаратов, применимых в клинической практике. ●

*Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК 02.740.11.5134), Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 08-04-01178-а) и Шведским советом по научным исследованиям (Swedish Research Council).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nichols W.W., Ledwith B.J., Manam S.V., et al. // *Ann N Y Acad Sci.* 1995. V. 772. P. 30–39.
- Powell K. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 799–801.
- Breathnach C.C., Clark H.J., Clark R.C., et al. // *Vaccine.* 2006. V. 24. P. 1180–1190.
- Bahloul C., Taieb D., Diouani M.F., et al. // *Vaccine.* 2006. V. 24. P. 1063–1072.
- Liu M.A., Wahren B. and Karlsson Hedestam G.B. // *Hum. Gene Ther.* 2006. V. 17. P. 1051–1061.
- Ulmer J.B., Wahren B. and Liu M.A. // *Trends Mol. Med.* 2006. V. 12. P. 216–222.
- Ahlen G., Soderholm J., Tjelle T., et al. // *J. Immunol.* 2007. V. 179. P. 4741–4753.
- Cui Z. // *Adv. Genet.* 2005. V. 54. P. 257–289.
- Laddy D.J. and Weiner D.B. // *Int. Rev. Immunol.* 2006. V. 25. P. 99–123.
- Duerr A., Wasserheit J.N. and Corey L. // *Clin. Infect. Dis.* 2006. V. 43. P. 500–511.
- Bachmair A. and Varshavsky A. // *Cell.* 1989. V. 56. P. 1019–1032.
- Donnelly J.J., Wahren B. and Liu M.A. // *J. Immunol.* 2005. V. 175. P. 633–639.
- Kutzel M.A. and Weiner D.B. // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. P. 776–788.
- Barouch D.H. // *J. Pathol.* 2006. V. 208. P. 283–289.
- Jechlinger W. // *Expert Rev. Vaccines.* 2006. V. 5. P. 803–825.
- Egan M.A., Megati S., Roopchand V., et al. // *Vaccine.* 2006. V. 24. P. 4510–4523.
- Megati S., Garcia-Hand D., Cappello S., et al. // *Vaccine.* 2008. V. 26. P. 5083–5094.
- Leifert J.A., Rodriguez-Carreno M.P., Rodriguez F., et al. // *Immunol. Rev.* 2004. V. 199. P. 40–53.
- Yewdell J.W. // *Curr. Opin. Immunol.* 2007. V. 19. P. 79–86.
- van Bergen J., Ossendorp F., Jordens R., et al. // *Immunol. Rev.* 1999. V. 172. P. 87–96.
- Hershko A. and Ciechanover A. // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. V. 67. P. 425–479.
- Bachmair A. and Varshavsky A. // *Cell.* 1989. V. 56. P. 1019–1032.
- Rogers S., Wells R. and Rechsteiner M. // *Science.* 1986. V. 234. P. 364–368.
- Yamano H., Gannon J. and Hunt T. // *Embo J.* 1996. V. 15. P. 5268–5279.
- Bonifacino J.S. and Traub L.M. // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. P. 395–447.
- Restifo N.P., Bacik I., Irvine K.R., Yewdell J.W., McCabe B.J., Anderson R.W., Eisenlohr L.C., Rosenberg S.A., Bannink J.R. // *J. Immunol.* 1995. V. 154. P. 4412–4422.
- Townsend A., Bastin J., Gould K., Brownlee G., Andrew M., Coupar B., Boyle D., Chan S., Smith G. // *J. Exp. Med.* 1988. V. 168. P. 1211–1224.
- Wong S.B.J., Buck C.B., Shen X., Siliciano R.F. // *J. Immunology.* 2004. V. 173. P. 3073–3083.
- Wu Y., Kipps T.J. // *J. Immunol.* 1997. V. 159. P. 6037–6043.
- Tobery T. and Siliciano R.F. // *J. Immunol.* 1999. V. 162. P. 639–642.
- Singh R.A., Wu L. and Barry M.A. // *J. Immunol.* 2002. V. 168. P. 379–391.
- Bazhan S.I., Belavin P.A., Seregin S.V., et al. // *Vaccine.* 2004. V. 22. P. 1672–1682.
- Ilyinskii P.O., Meriin A.B., Gabai V.L., et al. // *Vaccine.* 2008. V. 26. P. 2177–2185.
- Altstein A.D., Gitelman A.K., Smirnov Y.A., Piskareva L.M., Zakharova L.G., Pashvykina G.V., Shmarov M.M., Zhirnov O.P., Varich N.P., Ilyinskii P.O., Shneider A.M. // *Arch. Virol.* 2006. V. 151. P. 921–931.
- Wong S.B., Buck C.B., Shen X., et al. // *J. Immunol.* 2004. V. 173. P. 3073–3083.
- Vidalin O., Tanaka E., Spengler U., et al. // *DNA Cell. Biol.* 1999. V. 18. P. 611–621.
- Orlowski M. and Wilk S. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. V. 415. P. 1–5.
- Murakami Y., Matsufuji S., Kameji T., et al. // *Nature.* 1992. V. 360. P. 597–599.
- Hayashi S., Murakami Y. and Matsufuji S. // *Trends Biochem. Sci.* 1996. V. 21. P. 27–30.
- Murakami Y., Matsufuji S., Hayashi S., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 267. P. 1–6.
- Starodubova E.S., Boberg A., Litvina M., et al. // *Vaccine.* 2008. V. 26. P. 5170–5176.
- Isaguliant M.G., Zuber B., Boberg A., et al. // *Vaccine.* 2004. V. 22. P. 1810–1819.
- Boberg A. and Isaguliant M. // *Expert Rev. Vaccines.* 2008. V. 7. P. 131–145.
- Nash P.D., Opas M. and Michalak M. // *Mol. Cell. Biochem.* 1994. V. 135. P. 71–78.
- Spee P. and Neefjes J. // *Eur. J. Immunol.* 1997. V. 27. P. 2441–2449.
- Sadasivan B., Lehner P.J., Ortmann B., et al. // *Immunity.* 1996. V. 5. P. 103–114.
- Cheng W.F., Hung C.F., Chai C.Y., et al. // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 108. P. 669–678.
- Cheng W.F., Hung C.F., Chen C.A., et al. // *Vaccine.* 2005. V. 23. P. 3864–3874.
- Peng S., Ji H., Trimble C., et al. // *J. Virol.* 2004. V. 78. P. 8468–8476.
- Hung C.F., Hsu K.F., Cheng W.F., et al. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 1080–1088.
- Sominskaya I., Alekseeva E., Skrastina D., et al. // *Mol. Immunol.* 2006. V. 43. P. 1941–1952.
- Klionsky D.J. and Emr S.D. // *Science.* 2000. V. 290. P. 1717–1721.
- Yorimitsu T. and Klionsky D.J. // *Cell. Death Differ.* 2005. V. 12 Suppl. 2. P. 1542–1552.
- Paludan C., Schmid D., Landthaler M., et al. // *Science.* 2005. V. 307. P. 593–596.
- Deretic V. // *Curr. Opin. Immunol.* 2006. V. 18. P. 375–382.
- Majeski A.E. and Dice J.F. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004. V. 36. P. 2435–2444.
- Prlc M., Williams M.A., Bevan M.J. // *Curr. Opin. Immunol.* 2007. V. 19. P. 315–319.
- Epstein J.E., Gorak E.J., Charoenvit Y., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2002. V. 13. P. 1551–1560.
- Bonifacino J.S. and Glick B.S. // *Cell.* 2004. V. 116. P. 153–166.
- Bonifacino J.S. and Dell'Angelica E.C. // *J. Cell. Biol.* 1999. V. 145. P. 923–926.
- Letourneur F. and Klausner R.D. // *Cell.* 1992. V. 69. P. 1143–1157.
- Helenius A. and Aebi M. // *Annu. Rev. Biochem.* 2004. V. 73. P. 1019–1049.
- Baranski T.J., Faust P.L. and Kornfeld S. // *Cell.* 1990. V. 63. P. 281–291.
- Steele R., Lee W.S. and Kornfeld S. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 33318–33323.
- Munz C. // *Cell. Microbiol.* 2006. V. 8. P. 891–898.
- Odorizzi C.G., Trowbridge I.S., Xue L., et al. // *J. Cell. Biol.* 1994. V. 126. P. 317–330.
- Gupta S.N., Kloster M.M., Rodionov D.G., et al. // *Eur. J. Cell. Biol.* 2006. V. 85. P. 457–467.
- Wu T.C., Guarnieri F.G., Staveley-O'Carroll K.F., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1995. V. 92. P. 11671–11675.
- Marques E.T., Jr., Chikhlikar P., de Arruda L.B., et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 37926–37936.
- Ruff A.L., Guarnieri F.G., Staveley-O'Carroll K., et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 8671–8678.
- de Arruda L.B., Chikhlikar P.R., August J.T., et al. // *Immunology.* 2004. V. 112. P. 126–133.
- Starodubova E., Boberg A., Ivanov A., et al. // *Vaccine.* 2010. V. 28. P. 1975–1986.
- Raviprakash K., Marques E., Ewing D., et al. // *Virology.* 2001. V. 290. P. 74–82.
- Anwar A., Chandrasekaran A., Ng M.L., et al. // *Virology.* 2005. V. 332. P. 66–77.
- Chen C.H., Wang T.L., Hung C.F., et al. // *Vaccine.* 2000. V. 18. P. 2015–2022.
- Ji H., Wang T.L., Chen C.H., et al. // *Hum. Gene Ther.* 1999. V. 10. P. 2727–2740.
- Deng H., Kowalczyk D., O I., et al. // *Cell. Immunol.* 2002. V. 215. P. 20–31.
- Bakke O. and Dobberstein B. // *Cell.* 1990. V. 63. P. 707–716.
- Lotteau V., Teyton L., Peleraux A., et al. // *Nature.* 1990. V. 348. P. 600–605.
- Sanderson S., Frauwirth K. and Shastri N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1995. V. 92. P. 7217–7221.
- Holst P.J., Sorensen M.R., Mandrup Jensen C.M., et al. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 3339–3346.
- Mwangi W., Brown W.C., Splitter G.A., et al. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2007. V. 14. P. 304–311.
- Schmid D., Pypaert M. and Munz C. // *Immunity.* 2007. V. 26. P. 79–92.
- Rosati M., von Gegerfelt A., Roth P., et al. // *J. Virol.* 2005. V. 79. P. 8480–8492.

УДК 578.7

# Экологические основы рациональной фаговой терапии

А.В. Летаров<sup>\*</sup>, А.К. Голомидова, К.К. Тарасян

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 2

\*E-mail: letarov@gmail.com

**РЕФЕРАТ** Знание особенностей взаимоотношений бактерий и их вирусов в средах организма человека и животных является основой для любых попыток управления этими процессами, в т.ч. и для фаговой терапии бактериальных инфекций. Однако до сих пор наше понимание значения бактериофагов для экологии симбиотических микробных сообществ и степени их участия в гомеостазе макроорганизма является крайне фрагментарным. Анализ доступных данных позволяет предположить, что механизмы, обуславливающие стабильное сосуществование фагов и чувствительных к ним бактерий, не одинаковы как у различных видов, так и в различных участках экотопов тела животных одного вида. Регуляторное действие фагов на бактериальные популяции зависит от специфических биологических и физико-химических условий, таких как рН, концентрации доступных субстратов, плотность популяции потенциальных хозяев, ассоциации бактерий-хозяев со слизистыми оболочками и другими поверхностями, присутствия веществ, специфически ингибирующих адсорбцию фагов и др. В процессе фаговой терапии часто возникают сложные экологические взаимодействия между популяциями патогенных бактерий, фагами, применяемыми в качестве антибактериальных агентов, и самим макроорганизмом. В обзоре рассмотрены накопленные к настоящему моменту сведения об экологии естественных бактериофагов в микробных системах, связанных с организмом животных и человека, а также экологические и физиологические процессы, определяющие эффективность терапевтического использования препаратов бактериофагов у млекопитающих.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** бактериофаги, фаговая терапия, микрофлора тела человека, микрофлора тела животных, экология бактериофагов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; БОЕ – бляшкообразующая единица, соответствует жизнеспособной частице бактериофага, если эффективность посева на данном штамме в данных условиях близка к 1; КОЕ – колониеобразующая единица, соответствует одной жизнеспособной бактериальной клетке.

## ВВЕДЕНИЕ

Использование бактериофагов в качестве противобактериальных агентов было предложено одним из первооткрывателей феномена бактериофагии Ф. д'Эрелем, который впервые применил фаговый препарат для лечения тяжелой дизентерии у ребенка в 1919 г., всего через два года после публикации его первой статьи, сообщавшей об открытии вирусов бактерий [1, 2]. Период массового увлечения терапевтическим применением фагов в западной медицине в конце 30-х – начале 40-х гг. сменился практически полным забвением этого подхода, чему способствовали, с одной стороны, весьма нестабильные результаты, объясняющиеся во многом недостаточным развитием биологии фагов, технологией производства, хранения и применения их лечебных препаратов, а с другой стороны, триумфом антибиотикотерапии бактериальных инфекций, сулившей более простое и надежное решение большинства клинических задач в этой области [2]. Тем не менее, разработка и применение лечебных фаговых препаратов никогда не прекращались в Советском Союзе, а в дальнейшем и в Польше и Чехии. Накопленный в этих странах обширный опыт

свидетельствует о высокой эффективности и безопасности препаратов бактериофагов. В настоящее время массовое производство таких противобактериальных средств, зарегистрированных национальными органами здравоохранения, сохраняется в России и в Грузии (где с 1930-х гг. действует Институт бактериофага, микробиологии и вирусологии (ныне им. Г. Элиавы), созданный при личном участии Ф. д'Эреля). В Польше препараты фагов производятся и применяются в специализированном центре в Институте Иммунологии и экспериментальной терапии во Вроцлаве.

В связи с широким распространением лекарственной резистентности патогенных микроорганизмов и с резким снижением темпов разработки и коммерциализации новых антибактериальных агентов в последние 20 лет интерес к фаготерапии резко возрос, как в отечественной, так и в западной медицине [3, 4]. По проблеме фаговой терапии в последнее время опубликован ряд обзоров [2, 5, 6, 7].

В современной фаговой терапии находят применение главным образом бактериофаги, относящиеся по классификации международного комитета по таксономии вирусов

(ICTV) к порядку Caudovirales (tailed phages, «хвостатые фаги»). Эти вирусы составляют около 96 % всех описанных бактериофагов [8]. Хвостатые фаги подразделяются на три семейства:

1. Podoviridae, имеющие короткий несократимый хвостовой отросток (хвост);
2. Siphoviridae, снабженные длинным несократимым хвостом;
3. Myoviridae, обладающие сократимым хвостом.

Существенным экологическим значением обладают также РНК-содержащие фаги семейства Leviviridae, а также нитчатые фаги, содержащие однополовую ДНК, принадлежащие к семейству Inoviridae. Вирионы левивирусов имеют форму маленьких (около 26 нм) икосаэдрических частиц, содержащих однополовую РНК-геном. Нитевидные частицы иновирусов представляют собой молекулы кольцевой однополовой ДНК, покрытые оболочечными белками низкой молекулярной массы.

Представители других семейств вирусов прокариот (всего их официально насчитывается к настоящему моменту 14) встречаются, по-видимому, редко и (вероятно) не имеют большого значения для микроэкологии симбиотических микробных сообществ млекопитающих. Более детальные сведения о классификации бактериофагов и биологии отдельных их групп можно найти в работе [8], а также в книге [9].

Несмотря на тот факт, что вирулентные бактериофаги (т.е. такие, которые не обладают способностью к интеграции своего генома в геном бактерии и формированию т.н. лизогенных штаммов) вызывают гибель всех инфицированных ими бактериальных клеток и способны в определенных условиях к лавинообразному размножению и уничтожению большого количества чувствительных к ним микроорганизмов, эти вирусы стабильно сосуществуют со своими хозяевами практически во всех природных экосистемах [10]. Такое сосуществование длится на протяжении всей обзоримой истории жизни на Земле [11], при этом на популяционном уровне взаимодействия между бактериями и фагами достаточно сложны и многообразны, и однозначная интерпретация фагов как «естественных врагов» бактерий не отражает истинного положения вещей.

Организм человека или животного представляет собой с точки зрения микробиолога сложный макрокосм, включающий несколько взаимосвязанных экологических систем, локализованных в различных органах и участках тела [12], которые заселены более или менее плотными сообществами микроорганизмов, включающих в т.ч. и бактериофаги [13].

Роль бактериофагов в микрофлоре тела в последнее время принято признавать «существенной», однако детальная информация по этому вопросу в большинстве случаев отсутствует. Присутствие бактериофагов в составе нормальной микрофлоры тела впервые продемонстрировал их первооткрыватель Феликс д'Эрель. Он обнаружил фаги энтеробактерий в фекалиях человека и некоторых видов животных [1]. Тем не менее ни качественные, ни тем более количественные описания и модели взаимоотношений популяций фагов и бактерий в симбиотических микробных системах пока не разработаны ни для одного вида животных. Понимание особенностей эколого-физиологических

взаимоотношений в тройственной системе «бактерии – фаги – макроорганизм» должно служить теоретической основой для управления этой системой, в т.ч. и путем введения экзогенных фаговых препаратов, предназначенных для элиминации нежелательных бактериальных популяций.

Целью настоящего обзора является анализ современных представлений об экологии вирусов бактерий в симбиотических микробных системах человека и животных, механизмах прямого взаимодействия эндогенных и экзогенно вводимых фаговых частиц с клетками и органами макроорганизма, а также краткое рассмотрение основных теоретических принципов, лежащих в основе терапевтического применения фаговых препаратов.

## БАКТЕРИОФАГИ В СОСТАВЕ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ ТЕЛА

### КОЛИЧЕСТВО И РАЗНООБРАЗИЕ ФАГОВ В МИКРОФЛОРЕ ЖИВОТНЫХ

Наиболее многочисленны работы, посвященные исследованию бактериофагов в желудочно-кишечном тракте млекопитающих (см. ниже), включая толстый кишечник (и фекалии), а также микрофлору рубцов жвачных и преджелудков сумчатых животных [14], где они составляют абсолютное большинство свободных вирусных частиц [13–26]. Интересно, тем не менее, отметить, что большинство РНК-содержащих вирусов в фекалиях человека представлено частицами вирусов растений, поглощаемыми с пищей [27]. Присутствие свободных фаговых частиц не было до сих пор зафиксировано на коже или в легких животных. Однако в некоторых патологических состояниях, таких как муковисцидоз, в легочном отделяемом обнаруживали фаги к одновременно присутствующим бактериям, включая *Pseudomonas aeruginosa* [28]. По не вполне понятным причинам свободные частицы бактериофагов не удалось пока зафиксировать в полости рта [29].

Поскольку симбиотические сообщества желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) животных и человека включают до нескольких сотен видов (и, соответственно, до тысяч штаммов) бактерий и архей, каждый из которых потенциально подвержен фаговой инфекции, подавляющее большинство фагов, населяющих среды организма, невозможно исследовать культуральными методами. Однако применение прямых методов исследования, таких как выделение и очистка некультивируемых вирусных сообществ из содержимого различных отделов ЖКТ и их исследование методами световой и электронной микроскопии, электрофоретического разделения, а также метагеномики, дало возможность оценить представленность и уровень разнообразия фагов в соответствующих микробных сообществах. Детальное рассмотрение этих работ выходит за рамки данной статьи; их подробный анализ приведен в обзоре [13]. Отметим лишь, что концентрация свободных фаговых частиц в сообществах толстого кишечника и в рубце жвачных животных составляет по разным оценкам  $10^8$ – $10^{11}$  частиц на мл<sup>-1</sup>. Число различимых морфологических типов составляет от первых десятков до сотен, а количество генотипов оценивается от нескольких сотен до 1200 [13]. Общая численность фагов и их качественный состав могут под-



вергаться существенным изменениям во времени. Вопрос о приуроченности определенных типов фагов к различным видам животных, а также проблемы биологической географии фагов, ассоциированных с животными и человеком, остаются практически неисследованными.

### КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ БАКТЕРИОФАГИ В НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЕ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Хозяйская специфичность бактериофагов обычно достаточно узка и ограничена, как правило, определенным набором штаммов, принадлежащих к одному или нескольким очень близким видам бактерий. В некоторых случаях, однако, фаги могут инфицировать бактерии нескольких различных видов или даже родов. Ф. д'Эрель (1921) впервые предположил, что выделение фагов *Yersinia pestis* из фекалий крыс через 3 мес. после завершения эпидемии чумы может объясняться ростом этих вирусов на бактериях других видов (на наш взгляд, этот результат может быть также объяснен персистенцией йерсиний у крыс). Персистенцию вибриофагов у устриц при отсутствии заметного количества хозяев в течение зимнего периода наблюдали в недавней работе [30]; авторы предположили, что вибриофаги могут использовать альтернативных хозяев. Таким образом, мультивидовая или мультиродовая специфичность некоторых фагов может иметь определенное экологическое значение в симбиотической микрофлоре животных. Тем не менее во многих случаях даже близкие штаммы одного вида могут существенно отличаться по чувствительности к бактериофагам. Это означает, что воздействие фаговой инфекции на различные популяции отдельных видов или штаммов, населяющих одну и ту же экосистему тела животного, может различаться очень существенно. Культуральные методы являются в настоящее время единственным подходом, позволяющим изучать экологические взаимоотношения фагов и их хозяев с разрешением на уровне отдельных штаммов.

В литературе имеется значительное число сообщений о выделении и характеристике тех или иных бактериофагов из образцов, полученных от животных и человека. Бактериофаги *Streptococcus bovis*, *S. durans*, *Prevotella bryantii*, *Bifidobacterium ruminale* были выделены из рубцового содержимого разных видов жвачных [14, 31]. Фекалии человека и различных животных послужили источником выделения фагов *E.coli*, *Salmonella*, *Bacteroides*, *Klebsiella* и других бактерий [32–43]. В большинстве случаев фаги выделялись с использованием лабораторных штаммов соответствующих видов либо полевых изолятов, полученных и охарактеризованных заблаговременно.

Присутствие и титры ДНК-содержащих колифагов сильно варьируют у разных видов животных и между отдельными особями. Это хорошо согласуется с данными о том, что некультивируемое вирусное сообщество является высоковариабельным [44, 45]. В то же время отсутствуют сообщения о специфической ассоциации каких-либо типов или групп ДНК-содержащих колифагов с определенным видом животных. Напротив, присутствие F-специфических РНК-содержащих (F-РНК) колифагов (семейства *Leviviridae*) в фекалиях животных обладает определенной видовой специфичностью. Эти бактериофаги могут быть подразделены на четыре генетических группы, которые

различаются также серологически. Встречаемость отдельных серотипов существенно различается у разных видов животных: фекалии лошадей, например, редко содержат F-специфические фаги, тогда как более 70 % образцов помета кур обнаруживают высокие титры этих вирусов ( $10^5$ – $10^7$  БОЕ $\times$ г $^{-1}$ ). Только 10–20 % образцов человеческих фекалий содержат F-РНК фаги, но встречаемость групп II и III в этих образцах значительно выше (> 80 % от общего числа изолятов), чем у животных, у которых группы I и IV преобладают примерно в такой же степени [33, 39, 42, 46]. К настоящему времени удовлетворительного объяснения такой связи не предложено.

Обнаружение возможной ассоциации некоторых генетических подгрупп в пределах установленных родов хвостатых бактериофагов с определенными видами макрохозяев может быть затруднено, поскольку простые и производительные методы селективного выделения генетически родственных фагов из полевых образцов не разработаны. Почти селективное выделение фагов, родственных T-четным, из фекалий педиатрических пациентов с диареей в Бангладеш происходило при использовании тест-культуры штамма *E.coli* K803 [47]. Посев тех же самых образцов на газон энтеропатогенного штамма *E.coli* O127:K63 приводил к выделению совершенно иного набора фагов, причем все они принадлежали к семейству *Siphoviridae* [47].

### ИССЛЕДОВАНИЯ ИНДИГЕННЫХ ФАГОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

Furuse et al. [36] обнаружили, что титры колифагов в фекалиях здоровых людей обычно низки и пул свободных фаговых частиц формируется у них в основном за счет умеренных фагов. Эти данные свидетельствуют о том, что у здоровых людей продукция фаговых частиц в кишечнике происходит в основном за счет спонтанной индукции лизогенных бактерий. И, таким образом, размножение фагов в литическом цикле имеет ограниченное значение для экологии коолиформных бактерий в кишечнике человека. В противоположность здоровым людям, у некоторых пациентов, страдающих внутренними болезнями или лейкемией, титры колифагов были выше, и значительную часть высеваемых бактериофагов составляли вирулентные фаги [46]. У нескольких пациентов увеличение титров колифагов коррелировало с ухудшением состояния.

С результатами работы [36] согласуются безуспешные попытки выделить колифаги из фекалий собак с использованием индигенных штаммов *E.coli* [48]. При использовании в качестве хозяев более 500 индигенных штаммов *E.coli*, выделенных из 6 образцов фекалий собак, содержащихся в домашних условиях, колифагов обнаружено не было. Лишь один из этих образцов содержал фаги, активные в отношении лабораторного штамма *E.coli* C. Однако у 16 собак, содержащихся в приюте, были обнаружены титры колифагов от 0 до  $10^7$  БОЕ $\times$ г $^{-1}$ . Авторы предполагают, что отсутствие фагов у домашних собак связано с их изоляцией от себе подобных и со «слишком чистыми» условиями содержания. Реконтактация фекальными микроорганизмами, очевидно, ограничена и у людей, что может отчасти объяснить вышеприведенные результаты [36].

Результаты нашей недавней работы, выполненной с использованием лошадей в качестве модельного объекта [15, 49], находятся в противоречии с данными работы [46]. У лошадей целлюлолитическое микробное сообщество, локализованное в толстом кишечнике, отличается высокой сложностью и включает в себя до 500 видов бактерий, архей, а также грибов и простейших. В отличие от рубцового сообщества микробная биомасса толстого кишечника лошадей не подвергается последующему ферментативному гидролизу и экскретируется с фекалиями в практически неизменном виде. Физико-химические условия в толстом кишечнике лошадей являются, по-видимому, более стабильными, чем у многих других видов животных, т. к. среднее время переваривания богатой целлюлозой пищи (травы) составляет до 72 ч, значительно больше, чем промежуток между актами приема пищи или дефекации [50].

Для того чтобы исследовать экологические взаимоотношения колифагов и их хозяев в этой системе, мы проследили динамику титров колифагов и колиформных бактерий у 4 животных с отбором образцов каждые 48 ч. При этом для определения титров фагов использовалась тест-культура лабораторного штамма *E. coli* C600. Мы наблюдали значительные по амплитуде колебания титров фагов (2–4 логарифмических единицы у разных животных в течение 16-дневного периода наблюдений). В то же время титры колиформных бактерий были значительно стабильнее и колебались около значения  $5 \times 10^5$  КОЕ $\times$ г $^{-1}$ .

В работе [36], в 9 сериях образцов, полученных от 19 здоровых людей с двухнедельными интервалами, не обнаружили значительных временных изменений титров колифагов и их биологического разнообразия. Различия динамики колифагов у людей и лошадей может отражать более значимый вклад фаговой инфекции в экологию энтеробактерий у последних.

Отсутствие корреляции между титрами колиформ и колифагов у исследованных животных может быть объяснено высокой степенью разнообразия штаммов *E. coli* и других энтеробактерий, составляющих пул колиформ в кишечнике лошадей [51]. Для дифференциации близкородственных изолятов, которые, однако, могут различаться по чувствительности к фагам, мы предложили простую систему геномного ПЦР-фингерпринтинга [49]. Используя эту систему, мы продемонстрировали, что пул колиформных бактерий, содержащийся в образцах фекалий лошадей, включает до 1500 индивидуальных штаммов (оценка с помощью непараметрического критерия *Chao1*). Доля штаммов колиформ, чувствительных к отдельному изоляту колифага, полученному из того же образца, в среднем составила 1–3 % штаммов. Разнообразие бактериофагов, активных в отношении отдельного индигенного штамма *E. coli* (полученного из того же образца), как правило, очень низко и ограничивается 1–2 генотипами, различимыми с помощью рестрикционного анализа. Разнообразие фагов, высеваемых на лабораторном штамме *E. coli* C600, было также ограничено 1–3 типами в каждом исследованном образце. По всей видимости, эта ситуация отражает напряженную конкуренцию вирусов за доступные клетки хозяев.

## ВЛИЯНИЕ ФАГОВОЙ ИНФЕКЦИИ НА ПОПУЛЯЦИИ БАКТЕРИЙ В ЖКТ

Микробная биомасса может составлять до 54 % влажного веса фекалий человека [52]. Колиформные бактерии (> 80 % которых обычно представлены штаммами *E. coli*) обычно присутствуют в фекалиях людей и многих животных в титрах  $10^5$ – $10^8$  КОЕ $\times$ г $^{-1}$  [39]. *Streptococcus bovis* выявляется в рубцовой жидкости овец в концентрациях  $10^6$ – $10^7$  КОЕ $\times$ мл $^{-1}$  [14, 53]. Эти плотности популяций превышают пороговый уровень, необходимый для экспоненциального размножения фагов, составляющий около  $10^4$  клеток $\times$ мл $^{-1}$  для большинства систем фаг–хозяин [54]. Таким образом, должны существовать определенные механизмы, стабилизирующие сосуществование фагов и бактерий.

Мы предполагаем, что инфекция колифагами представляет собой селективирующий фактор, ответственный за поддержание высокого уровня внутривидового разнообразия колиформ в кишечнике лошадей, ограничивая несколько «наиболее приспособленным» штаммам возможность вытеснить остальные. С другой стороны, это разнообразие сильно ограничивает доступность клеток хозяев для каждого отдельного типа колифагов, стабилизируя, таким образом, систему. Высокий уровень разнообразия и ретикулярная организация делают затруднительным прямой дифференциальный мониторинг численности отдельных штаммов и связанных с ними фагов с целью прямой проверки данной гипотезы. Однако недавно нами был обнаружен эффект резкого понижения внутривидового разнообразия колиформ у лошади, получавшей перорально энрофлоксацин в течение длительного периода лечения тяжелого ранения конечности. При этом общий титр колиформ оставался в пределах нормальных значений (доминирующие штаммы были устойчивы к антибиотикам). Использование таких животных с искусственно сниженным внутривидовым разнообразием симбиотических колиформ в качестве модельного объекта экологии бактериофагов, может позволить провести прямое экспериментальное тестирование нашей гипотезы. Другим возможным подходом к решению этой проблемы является исследование процесса установления нормальной микрофлоры у новорожденных животных.

Структура сообщества кишечных колиформных бактерий и колифагов у лошадей согласуется с результатами математического и экспериментального моделирования развития микробных сообществ, включающих бактерии и их фаги, в условиях, которые допускают коэволюцию обоих компонентов [55–58]. В этих экспериментах наблюдалось расщепление популяции хозяев на множество генетических линий, различавшихся по чувствительности к фагам. В свою очередь фаги испытывали селекцию на расширение спектра хозяев ценой уменьшения эффективности адсорбции. Таким образом, сложность исходно двухкомпонентной системы многократно возрастала [57].

Взаимодействие с бактериофагами может также способствовать отбору штаммов бактерий, несущих мутации в генах систем репарации неспаренных оснований или иные мутации, уменьшающие стабильность генома [59, 60]. Такие гипермутабельные штаммы получают преимущество только в быстро меняющейся среде, где возможность приобретения новых свойств «окупает» негативный эффект

накопления вредных мутаций [61]. Воздействие бактериофагов, также способных к эволюции *in situ*, является, по-видимому, одним из вариантов такого варибельного селективного давления. В естественных популяциях энтеробактерий было экспериментально продемонстрировано присутствие заметной доли гипермутабельных штаммов [62]. Таким образом, фаговая инфекция может способствовать формированию фенотипического разнообразия бактерий не только за счет прямого отбора устойчивых вариантов, но и за счет поддержания в популяции гипермутабельных штаммов.

Инфекция бактериофагами может играть также некоторую роль в последовательности событий, имеющих место в кишечном сообществе лошадей при перегрузке ЖКТ углеводами. Было высказано предположение, что какие-то токсины, продуцируемые измененной кишечной флорой, попадают в кровотоки и вызывают, прямо или косвенно, нарушение адгезии эпителия копыта к базальной мембране. Недавно было показано [63], что резкое увеличение числа клеток стрептококков группы *S. bovis / equinus* в толстом кишечнике происходит через 8–16 ч после дачи олигофруктана. Однако жизнеспособность этих бактерий очень быстро падает. Одно из возможных объяснений этого явления состоит в массовой инфекции стрептококков соответствующими фагами, по аналогии с явлением фагового контроля цианобактериального цветения воды [10].

Значительное селекционирующее воздействие природных фагов было продемонстрировано на популяции *Campylobacter jejuni* у кур. Наличие фагов *C. jejuni* в слепой кишке кур негативно коррелировало с уровнем колонизации бактерией (в среднем  $10^5$  КОЕ $\times$ г $^{-1}$  в образцах, содержащих фаги, против  $10^7$  КОЕ $\times$ г $^{-1}$  в образцах, где фагов не обнаруживалось) [64]. Позднее удалось показать, что присутствие фагов селекционирует варианты *C. jejuni*, несущие крупномасштабные перестройки генома [65], возникающие вследствие латерального переноса или как результат внутривидовых инверсий по двум Мю-подобным профагам, интегрированным в ДНК бактерии [66]. В обоих случаях варианты, чувствительные к фагам, имели значительное преимущество в способности колонизировать бройлерных кур. В отсутствие фагов популяция быстро возвращалась к чувствительному фенотипу. Авторы предположили, что геномные перестройки *C. jejuni*, возникающие в ЖКТ птиц, служат адаптивным механизмом, позволяющим пережить периоды активности фагов и последующую конкуренцию за ресурсы.

### ВОЗДЕЙСТВИЕ ИСКУССТВЕННО ВВОДИМЫХ ФАГОВ НА БАКТЕРИИ ЖКТ

Эффективная элиминация патогенных бактерий из ЖКТ с помощью фаговых препаратов была многократно продемонстрирована в экспериментах по терапевтическому применению фагов [2, 7]. Терапевтический эффект фагов может, однако, сводиться просто к уменьшению популяции патогена до уровня, при котором иммунная система хозяина способна эффективно контролировать его размножение. В некоторых опытах даже такие низкие дозы фага, как  $10^2$  БОЕ, могли предотвращать развитие инфекции при последующем экспериментальном заражении патогенной *E. coli* [67], при этом означенные низкие

дозы фага были значительно менее эффективны, если применялись после инокуляции патогеном. Это позволяет предположить, что популяция патогенной бактерии значительно более подвержена фаговой атаке до того, как ей удастся колонизировать определенные защищенные ниши в кишечнике.

Действие вводимого извне коктейля фагов на резидентные и интродуцированные популяции *E. coli* в кишечнике мышей исследовалось в работе [68]. Мыши, использованные в этих экспериментах, стабильно выделяли *E. coli* в титрах около  $10^6$  КОЕ $\times$ г $^{-1}$  фекалий. Эта величина несколько варьировала во времени, но присутствие естественных колифагов не детектировалось на индикаторном штамме *E. coli* K803, чувствительном ко всем фагам, использованным в последующих опытах. Мыши были подвергнуты действию фагового коктейля с титром  $10^7$  КОЕ $\times$ мл $^{-1}$ , добавляемого к воде. Эти фаги в сумме проявляли активность практически против 100 % резидентных штаммов, полученных от этих же животных до начала эксперимента. Тем не менее воздействие вводимых извне фагов на титры колiformных бактерий в фекалиях было незначительным, при этом фаги не могли самоподдерживаться в кишечнике за счет инфекции резидентных бактерий. Изоляты *E. coli*, полученные во время эксперимента, сохраняли те же паттерны чувствительности к компонентам коктейля, как и до эксперимента. В то же время эти фаги были способны очень эффективно снижать численность популяции чувствительного штамма *E. coli*, интродуцированного гнотобиотическим мышам за неделю до приема фагового коктейля. При этом происходила активная репликация фага в кишечнике. Однако выжившая часть популяции оставалась чувствительной к фагам, что позволяет предположить существование в кишечнике мышей определенных сайтов, в которых клетки оказываются физически или физиологически защищены от фаговой инфекции. Так как практически вся резидентная популяция обычных мышей защищена, эти «укрытия», по-видимому, покрывают практически все ниши, пригодные для длительной колонизации *E. coli* в кишечнике мышей. Интересно отметить, однако, что мыши, полученные из того же питомника через 1 год после описанных экспериментов, практически не содержали *E. coli* в своем кишечнике и были колонизированы другими видами энтеробактерий [Brüssow, личное сообщение]. С этим наблюдением согласуются результаты работы [69], в которой было обнаружено, что менее 20 % из 48 исследованных ею мышей содержали резидентную *E. coli* в ЖКТ, при этом колифаги присутствовали в минимальных титрах. Автор предположила, что одним из основных барьеров для размножения колифагов в ЖКТ мыши является отсутствие достаточной популяции хозяев.

На продукцию фагов в кишечнике оказывают также влияние физико-химические факторы среды. Желчные соли и углеводы, например, могут оказывать ингибирующее действие на адсорбцию ряда колифагов [70]. Этот эффект нивелируется экспрессией белка Ag43, представляющего собой поверхностный адгезин бактерий, способствующий агрегации клеток, например при образовании биопленок. Синтез Ag43 регулируется по типу фазовых вариаций, таким образом фаговая инфекция может при некоторых обстоятельствах селекционировать клет-



ки с пониженной способностью к образованию биопленок. Необходимо отметить, что на некоторые фаги *Bacteroides* добавление желчных солей к среде культивирования производило противоположный эффект, улучшая эффективность посева [71].

Рост в составе биопленок на поверхности слизистой оболочки или на пищевых частицах может также играть существенную роль в ограничении фаговой инфекции бактерий в ЖКТ. По некоторым данным [72], популяция *E. coli* в просвете кишечника мышей представлена клетками в состоянии голодания, физиологически мало пригодными для размножения фагов. Активно размножающаяся часть популяции может быть локализована только в микроколониях на поверхности слизистой оболочки кишечника этих животных [73]. В обеих работах, однако, были использованы мыши, обработанные стрептомицином и искусственно инокулированные единственным штаммом *E. coli* ВJ4 с известным фенотипом. Кроме того, нужно отметить, что физиология пищеварения у мышей может существенно отличаться от более крупных животных. У мышей скорость метаболических процессов значительно выше, а время прохождения пищи по кишечнику меньше, чем, например, у человека или лошади. Более того, отношение площади слизистой оболочки к объему просвета кишечника у мышей значительно выше, что создает условия для более быстрого всасывания питательных веществ. Таким образом, вопрос о том, в какой мере данные, полученные на мышах, могут быть экстраполированы на более крупные виды животных, остается открытым.

#### **УЧАСТКИ ТЕЛА С ПОНИЖЕННЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ ФАГОВ НА МИКРОФЛОРУ**

По имеющимся данным, в кишечнике по меньшей мере некоторых видов животных бактериофаги успешно преодолевают различные физико-химические барьеры, препятствующие инфекции, и эффективно размножаются за счет резидентных популяций хозяев, представляя из себя фактор, лимитирующий их численность. Принимая во внимание открытый характер экосистемы ЖКТ в отношении обмена веществом с окружающей средой, значительная роль бактериофагов в ней является вполне ожидаемой. Однако ситуация может существенно отличаться в других экосистемах организма животных, также плотно заселенных микроорганизмами. Hitch et al. [29], например, не смогли выделить из ротовой полости людей фаги, активные в отношении индигенных бактерий, что позволило им сделать вывод, что бактерии в данной системе не подвержены существенному влиянию фаговой инфекции. Удовлетворительного объяснения этому факту пока не предложено.

В микробной системе рубца жвачных животных некоторые виды бактерий достигают значительных популяционных уровней. *S. bovis* может присутствовать в концентрациях  $10^6$ – $10^7$  КОЕ×мл<sup>-1</sup> [14, 53], причем вся популяция *S. bovis* у овец может принадлежать к единственному фаготипу [53]. Авторы наблюдали быструю смену доминирующего штамма на иной, обладающий другим фаготипом, но эти события не сопровождались появлением в рубцовой жидкости бактериофага, способного лизировать какой-либо из этих штаммов [53]. Тем не менее присутствие фагов *S.*

*bovis* в рубце в титрах  $10^1$ – $5 \times 10^4$  БОЕ×мл<sup>-1</sup>, варьирующих у разных индивидуумов, было позднее продемонстрировано [74].

Экология рубцовых стрептофагов активно изучалась Таракановым с соавт. в 1970–80-х гг. К сожалению, большинство работ этих авторов опубликовано в труднодоступных журналах и ведомственных отчетах, поэтому мы ссылаемся здесь на книгу [14], в которой дан детальный обзор их исследований. Авторами были обнаружены фаги *S. bovis* в рубцах коров и овец в титрах  $10^1$ – $10^4$  БОЕ×мл<sup>-1</sup>. В результате тщательно контролируемого полевого эксперимента было установлено, что пероральное применение препарата бактериофага *S. bovis* (стрептофагина) у коров приводило к увеличению концентрации фага в рубце на 4–5 порядков, сопровождающееся уменьшением количества амилитических бактерий, уменьшением общей амилитической и увеличением целлюлолитической активности рубцового содержимого. Эти изменения приводили к улучшению мясной и молочной продуктивности и улучшению качества продукции этих животных, что было подтверждено детальными и хорошо документированными исследованиями [14]. После прекращения дачи стрептофагина титры фагов в рубце быстро возвращались к исходному уровню, и количество амилитических бактерий возрастало. Полученные результаты свидетельствуют о том, что препарат одного единственного фага может оказывать воздействие на заметную часть популяции *S. bovis* в рубцах экспериментальных животных, что соответствует исследованиям [53] о низком внутривидовом разнообразии *S. bovis* в рубце овец. В то же время очевидно, что присутствует некоторый фактор, препятствующий эффективному размножению стрептофагов на резидентной популяции бактерий в этой системе.

Было показано, что таниновая кислота при физиологических концентрациях может ингибировать размножение бактериофагов, вызывая осаждение фаговых частиц [75]. Тараканов с соавт. [14] продемонстрировал, что рубцовая жидкость коров, а также уксусная кислота при физиологических концентрациях могут инактивировать бактериофаги *S. bovis*. При этом чувствительность разных фагов сильно варьировала и зависела от используемых концентраций инактивирующих веществ. Ингибирование активности фагов в рубце различными химическими веществами может играть ключевую роль в ограничении фагового лизиса резидентных бактерий. Эта модель согласуется с выводами работы [76] о том, что наблюдающийся массовый лизис бактериальной биомассы в рубце обусловлен, скорее, автолитическими процессами, нежели фаговой инфекцией.

Влагалище у женщин и самок животных также представляет собой интенсивно колонизируемую бактериями экологическую нишу. Наиболее существенной частью вагинальной микрофлоры людей являются лактобациллы. Виды и штаммы этих бактерий варьируют у различных индивидуумов [77], однако обычно у каждой отдельной женщины 1–2 штамма являются доминирующими [78]. Плотность колонизации довольно высока и составляет около  $10^6$ – $10^7$  КОЕ на вагинальный мазок. Таким образом, можно предположить, что это сообщество может подвергаться массовому

лизису бактериофагами. Однако все попытки выделения свободных фагов из вагинальных выделений были до сего момента безуспешны [79]. В то же время было показано, что лизогенные штаммы лактобацилл часто встречаются в вагинальном микробном сообществе [79, 80].

Хотя влагалище менее подвержено обмену бактериями и вирусами с внешней средой, за исключением передачи, связанной с сексуальной активностью, при исследовании вагинальных мазков, полученных от клинически здоровых женщин, часто наблюдается неожиданное резкое снижение численности лактобацилл. В большинстве случаев нормальная флора самопроизвольно восстанавливается, однако у некоторых индивидуумов возникает т.н. анаэробный бактериальный вагиноз – заболевание, при котором лактобациллярная флора замещается анаэробными бактериями, такими как *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Atapobium* and *Mobiluncus species*. По эпидемиологическим свойствам это заболевание имеет черты инфекции, передающейся половым путем [81, 82], хотя этиологический агент до сих пор не установлен. A. Blackwell [81] было сделано предположение, что причиной нарушения лактобациллярной флоры, приводящей в ряде случаев к развитию вагиноза, является фаговая инфекция. Мы предполагаем, что такого рода событие может возникать при попадании во влагалище лактобацилл, лизогенных по фагу, активному в отношении резидентного штамма.

Частота лизогенизации клеток хозяина умеренными фагами, как правило, невелика:  $10^{-1}$ – $10^{-2}$  [83–85]. Таким образом, размножение этих вирусов в экологической нише, плотно заселенной чувствительным штаммом хозяина, происходит, главным образом, по литическому пути, что приводит к гибели большинства клеток, которые потом могут быть замещены потомками клеток лизогенного штамма, исходно высвободившего фаг, а также вновь образованными лизогенными бактериями либо, при менее благоприятном стечении обстоятельств, другими видами бактерий. Такой сценарий был смоделирован математически и экспериментально [83] на модели популяций *E.coli*. Принимая во внимание, что частота спонтанной индукции многих лизогенных штаммов вагинальных лактобацилл составляет менее чем  $10^{-8}$  БОЕ×клетку<sup>-1</sup> [79] в лабораторных культурах, любой фактор, способствующий повышению частоты индукции, может увеличивать вероятность «экологической катастрофы» в вагинальном микробном сообществе. Это может объяснить существующую эпидемиологическую связь между курением и риском бактериального вагиноза [81], т.к. компоненты табачного дыма могут вызывать индукцию профагов у лактобацилл [86]. В то же время результаты работы [80] противоречат гипотезе Blackwell [81]. Эти авторы показали, что профаги лактобацилл часто теряют способность к индукции и к размножению на клетках, по-видимому, из-за отбора в присутствии перекиси водорода, продуцируемой многими штаммами этих бактерий, которая является активирующим агентом SOS-индуцибельных профагов. Детальное исследование временной динамики штаммов лактобацилл во влагалище и феномена лизогении у этих культур может дать ключ к проверке гипотезы о фаговом происхождении части случаев вагиноза.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФАГ–КЛЕТКА – ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ЭФФЕКТЫ

Во многих случаях полевые изоляты энтеробактерий (и, вероятно, других групп микроорганизмов) имеют частичную устойчивость к бактериофагам, присутствующим одновременно с ними. Эта устойчивость может выражаться в сниженной эффективности посева соответствующих фагов, медленной адсорбции или в снижении урожая фага, которое может быть обусловлено активностью систем рестрикции – модификации [59, 87], а также ряда систем специфической устойчивости бактерий к фагам определенных групп [59, 88, 89]. Кроме того, у прокариот широко распространены CRISPR (clusters of regularly interspaced palindromic repeats)-локусы [90], содержащие короткие фрагменты последовательностей, захватываемых за счет неизвестного пока механизма из геномов бактериофагов, плазмид и иных чужеродных ДНК. Ассоциированные с CRISPR гены кодируют белки, формирующие ферментативные комплексы, атакующие молекулы ДНК или РНК, содержащие последовательности, идентичные т.н. спейсерам CRISPR [91, 92]. Такого рода системы позволяют бактериям многих видов быстро формировать устойчивость к конкретным штаммам фагов, обусловленную снижением эффективности инфекции. Эта устойчивость может, однако, преодолеваться за счет точечных мутаций атакуемых последовательностей [28]. Количественные данные, характеризующие встречаемость и экологическую значимость в природных микробных сообществах систем устойчивости к фагам, действующих на стадии внутриклеточного развития вируса, на сегодняшний день отсутствуют. Этот вопрос, однако, заслуживает специального исследования, т.к. механизмы, вызывающие abortивную инфекцию, превращают часть клеток, адсорбирующих фаги, в экологические ловушки, существенно ускоряющие распад свободных фаговых частиц [94]. В нашем недавнем исследовании в среднем только 1–4% штаммов колиформных бактерий, изолированных из образцов фекалий лошадей, проявляли чувствительность к отдельному изоляту фага, выделенного из той же серии образцов, от того же животного. Интересно, что даже близкородственные бактериофаги, выделенные от одного и того же животного, могут иметь несколько различные спектры хозяев [49]. Это, по-видимому, отражает быструю адаптацию адсорбционного аппарата, происходящую *in situ*. Таким образом, уровень изоляции одновременно существующих в сообществе систем фаг–хозяин может быть значительно недооценен. В результате популяция каждой отдельной генетической линии фага существует в обстановке жесткой лимитации числом доступных клеток хозяев. В некоторых случаях эффективные концентрации фагов и чувствительных к ним клеток оказываются настолько низкими, что можно ожидать исчезновения фага из системы. Например, в описываемом выше случае концентрация в фекалиях лошади бактерий составляла  $10^3$ – $10^4$  КОЕ×мл<sup>-1</sup> [49, Тарасян с соавт., неопубликованные данные], что ниже пороговой концентрации, необходимой для эффективного размножения фага [54]. Концентрация же соответствующего вирулентного фага колебалась в диапазоне  $10^2$ – $10^5$  БОЕ×мл<sup>-1</sup>, при этом данный штамм бактериофага, идентифицируемый по рестриktionному профилю, персистирует в кишечнике данного животного

в течение более 2 лет [наши неопубликованные данные]. Механизмы, стабилизирующие длительное сосуществование этого вируса и его хозяев в кишечной экосистеме, остаются не вполне понятными. Очевидно, что любая адаптация бактериофага, расширяющая число потенциально пригодных хозяев, обеспечивает немедленное селективное преимущество.

Предполагается, что некоторые фаги могут нести «вторичные» белки адгезии, не связанные непосредственно с аппаратом, обеспечивающим проникновение ДНК в клетку. Многие из таких предположительных вторичных адгезинов несут иммуноглобулин-подобные домены, экспонированные на поверхности головок, сократимых чехлов хвоста или на конце воротничковых нитей фагов [95]. Некоторые фаги могут нести на воротничковых нитях домены, сходные с адгезинами, не родственными иммуноглобулинам [96]. Данные о том, что подобные структуры могут быть существенны для роста фагов в лабораторных условиях, пока отсутствуют, однако в экологической ситуации, подобной таковой в кишечнике животных, их роль может быть заметной, в частности за счет увеличения вероятности обратимой адсорбции при столкновении фаговой частицы с потенциально пригодной клеткой-хозяином. Увеличение скорости адсорбции, однако, «выгодно» далеко не во всех экологических ситуациях. При росте фагов на высокоплотных популяциях хозяев, иммобилизованных в вязкой агаровой среде (например, при посеве двуслойным методом), мутанты, имеющие более низкую константу адсорбции, получают значительное преимущество и образуют бляшки большего размера и с большим содержанием вирусных частиц [97]. Это связано с увеличением скорости диффузии вируса как в пределах вязкой среды, насыщенной клетками хозяев, так и в окружающую жидкую фазу. По мнению авторов, аналогичные преимущества медленно адсорбирующиеся фаги могут иметь при развитии внутри биопленок и при распространении на новые их участки. Механизмы, приводящие к обратимой утрате второстепенных адгезинов (например, части хвостовых фибрилл многих фагов) могут иметь, таким образом, существенное значение при адаптации фага к росту на биопленках бактерий или на планктонных клетках [97]. Интересно отметить, что второстепенные фибриллярные адгезины могут затруднять диффузию вязких сред, в т.ч. и за счет увеличения эффективного радиуса вирусных частиц [97]. Как следствие, препараты фагов, полученные путем наращивания в жидких и в плотных средах, могут быть обогащены генетическими вариантами, оптимально приспособленными к различным состояниям популяции хозяев. При этом фаги, дающие наиболее крупные бляшки, могут быть менее эффективными при росте в жидкой среде за счет сниженной скорости адсорбции. Эти соображения, возможно, следует принимать во внимание при разработке терапевтических фаговых препаратов.

Вклад лизогении в экологические взаимоотношения фагов и бактерий в симбиотических микробных сообществах животных также мало исследован. Данные исследований [36] дали возможность предположить, что индукция лизогенных бактерий является главным источником свободных частиц колифагов в кишечнике здоровых людей. Однако большинство умеренных колифагов, выделен-

ных из пула свободных фаговых частиц фекалий человека и животных, принадлежала к группе лямбдоидных фагов, в то время как фаги, полученные путем индукции лизогенных штаммов, относились в основном к группе P2-подобных [98]. В нашем недавнем исследовании все бактериофаги, полученные из фекалий лошадей, отнесенные к той или иной группе на основании морфологии частиц и секвенирования случайных фрагментов геномов, оказались профессионально-вирулентными фагами [49, наши неопубликованные данные]. На данном этапе не представляется возможным определить, отражает ли это расхождение результатов видовые различия кишечных микробных систем животных или связано с методологией исследования.

Колифаги, выделенные из фекалий, часто способны к формированию метастабильных ассоциаций, культивируемых в лабораторных условиях в течение нескольких пассажей, которые определены нами как псевдолизогенные ассоциации [А. Зимин, личное сообщение; наши неопубликованные данные]. Механизмы, стабилизирующие такие ассоциации, не всегда известны [99]. Наиболее вероятное объяснение состоит в том, что некоторая часть клеток в колонии частично защищена от фага полисахаридным материалом или в силу своего физиологического состояния в некоторых случаях наблюдается дивергенция бактерий и фагов в перевиваемой на агаре культуре, превращая псевдолизогенную ассоциацию в сложное многокомпонентное сообщество [наши неопубликованные данные]. Необходимы существенные дополнительные исследования, чтобы определить, играют ли псевдолизогенные ассоциации вирулентных фагов и их хозяев существенную роль в экологии колифагов *in vivo*, или этот феномен имеет чисто лабораторное значение.

## ФАРМАКОКИНЕТИКА ФАГОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

### ПРОНИКНОВЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ ВО ВНУТРЕННЮЮ СРЕДУ ОРГАНИЗМА

Известно, что бактериофаги могут проникать в кровяное русло из кишечника и других участков тела, заселенных микроорганизмами, и транспортироваться с кровью [100, 101]. По-видимому, наличие в циркулирующей крови определенного количества естественных бактериофагов является нормальным явлением; был даже предложен термин «физиологическая виремия» [101]. В недавнем экспериментальном исследовании фармакокинетики трех различных фагов у кур [102] показано, что при пероральном приеме фаговых препаратов лишь 1 из 3 используемых фагов обнаруживался в небольших количествах в печени и селезенке. Также данный фаг присутствовал в легких, куда он мог попасть случайно при введении суспензии в рот птиц с помощью шприца. Поэтому следует признать, что при таком способе введения эффективной транслокации фагов не наблюдалось, несмотря на то что в этой работе были использованы довольно высокие дозы фагов ( $10^6$ ,  $10^7$  и  $10^8$  БОЕ на особь). Несколько более интенсивным было проникновение фагов, применяемых в форме аэрозоля, через легкие. Однако в более ранних работах зарубежных авторов [100, 101] и отечественных исследователей [103–106] было неоднократно продемонстри-



ровано проникновение в кровь терапевтических фагов, применяемых перорально и ректально. При пероральном применении препарата «Секстафаг» (ФГУП «Микроген», Россия) бактериофаги обнаруживались в крови уже через час [105]. Аналогичные результаты были получены при применении этого препарата в форме ректального суппозитория [105, 106]. В данных работах не приведены дозы фагов (дается лишь объем принимаемого препарата), а также не указываются их титры в крови, кроме того, отсутствуют данные о различиях в проникновении разных фагов, входящих в состав данного комплексного препарата. Необходимо отметить, что скорость транслокации фагов, так же как и бактерий из ЖКТ в кровь, может существенно меняться в различных физиологических состояниях. При воспалительном ответе транслокация бактерий (и, вероятно, фагов) из кишечника значительно увеличивается [12]. Какие свойства фагов влияют на их перенос через эпителиальные барьеры – достоверно не установлено. Вероятно, это рецептор-зависимый транспорт, активно осуществляемый специализированными клетками иммунной системы (М-клетками, бокаловидными клетками) и, возможно, клетками эпителия кишечника и других отделов ЖКТ. В ряде работ были предприняты попытки идентификации аминокислотных последовательностей, ответственных за связывание с соответствующими рецепторами посредством технологии фагового дисплея [107–110]. Для этого библиотеки случайных пептидов, экспонированных на частицах нитчатого фага M13 (который сам по себе плохо проникает через слизистые ЖКТ), вводились в ЖКТ экспериментальных животных, после чего фаги выделяли из крови и внутренних органов или из соответствующих тканей самого ЖКТ и определяли последовательности экспонированных на них пептидов. В результате было установлено, что пептиды YPRLLTP [108] и CSKSSDYQC [110] улучшают процесс транспорта фага, пептиды LETTCASLCYPS и VPPHPMTYSCQY [109] усиливают связывание с М-клетками и тканью пейеровых бляшек крысы, а пептид LTHPQDSPPASA стимулирует связывание экспонирующей его вирусных частиц со слизистой оболочкой кишечника мышей, поврежденной в результате сильной системной воспалительной реакции [107]. В отличие от процитированных выше работ, в исследовании [111] не было обнаружено существенного влияния экспонируемых 7-членных пептидов на транспорт фага M13 из кишечника мышей в кровь. Вполне возможно, что этот результат связан с особенностями использованной авторами экспериментальной системы или с тем, что длины случайного пептида в 7 аминокислотных остатков недостаточно для эффективного связывания с соответствующими рецепторами клеток слизистых кишечника у мышей. В настоящее время в литературе отсутствуют публикации о попытках проводить селекцию терапевтически значимых фагов (главным образом т.н. хвостатых фагов) по признаку усиленной транслокации из ЖКТ в кровь. При этом успех в отборе длительно циркулирующих в крови вариантов фагов (см. ниже) позволяет надеяться, что хотя бы в некоторых случаях такая процедура может быть эффективной. Обращая на себя внимание имеющиеся данные о высокой эффективности транспорта в кровь фагов, вводимых ректально [103, 105].

Данный феномен уже используется в терапевтической практике, на российском рынке уже присутствуют препараты фагов, выпускающиеся в форме ректальных суппозитория (см. выше), однако механизмы транслокации фагов из прямой кишки и факторы, влияющие на этот процесс, требуют более пристального исследования.

При внутримышечном или интраперитонеальном введении фагов их проникновение в кровь и органы было значительно более интенсивным, чем при пероральном пути введения. Так, по данным [102], через 3 ч после внутримышечного введения курам  $10^8$  КОЕ трех фагов их концентрация в селезенке составляла  $2 \times 10^2 - 3 \times 10^4$  БОЕ  $\times$  г $^{-1}$  и  $6 \times 10^2 - 10^4$  КОЕ  $\times$  г $^{-1}$  в печени. В последующие часы концентрация фагов быстро падала, и через сутки фаги практически полностью элиминировались. Обращают на себя внимание существенные различия в эффективности проникновения в органы птиц различных типов фагов, инъецированных в одной и той же дозе. При интраперитонеальном введении мышам  $10^{11}$  БОЕ фагов (всего протестировано 4 фага) их концентрация в крови через 2 ч составляла  $5 \times 10^8 - 2 \times 10^{10}$  БОЕ  $\times$  мл $^{-1}$ , что свидетельствует о достаточно эффективном процессе проникновения фагов во внутреннюю среду организма [112]. В одной из ранних (но в то же время одной из наиболее тщательно выполненных) работ по фармакокинетике фагов [113] продемонстрировано эффективное проникновение бактериофагов *Shigella dysenteriae* через гематоэнцефалический барьер у мышей. При интраперитонеальной инъекции очищенных ультрафильтрацией лизатов фаги практически немедленно появлялись в крови. У здоровых животных их проникновение в ткань мозга отмечалось лишь в незначительном числе у некоторых особей. Напротив, в группе мышей, инфицированных *S. dysenteriae* внутричерепально в дозе, превышающей DL95 %, титр фага в ткани мозга быстро возрастал до  $10^7 - 10^9$  БОЕ  $\times$  г $^{-1}$ . В дальнейшем титр фагов в мозге падал медленнее, чем в крови. Выживаемость инфицированных мышей, получивших  $10^7 - 10^9$  БОЕ фага, составляла 72 % против 4 % в контрольной группе, которой вводили инактивированный нагреванием препарат.

#### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФАГОВЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОРГАНИЗМЕ И ИХ ЭЛИМИНАЦИЯ

Еще в ранних работах 20–30-х гг. [2] было показано, что бактериофаги быстро исчезают из циркулирующей крови. В крови мышей, получавших фаги интраперитонеально [112], быстро создавались очень высокие концентрации вирусов (до  $10^{10}$  БОЕ  $\times$  мл $^{-1}$ ), после чего их титр падал примерно на 3 порядка за 12 ч и далее снижался по более плавной кривой. Авторы аппроксимировали такую двухфазную кинетику уравнениями вида:  $C = 3.525 \times 10^9 \times e^{-0.753t} + 2.35 \times 10^7 \times e^{-0.0997t}$ , где  $C$  – концентрация, БОЕ  $\times$  мл $^{-1}$ ,  $t$  – время, ч, числовые коэффициенты варьировали для различных типов бактериофагов. В крови некоторые бактериофаги могут адсорбироваться на эритроцитах и лейкоцитах [93, 114]. Участвуют ли таким образом севестрированные фаги в инфекции целевых бактерий в процессе фаготерапии – не вполне понятно. Наиболее активно частицы фагов поглощаются печенью, где они быстро разрушаются [102, 115]. В селезенке фаги сохраня-

ются несколько дольше [2, 102, 116]. По-видимому, ретикулоэндотелиальная система играет ведущую роль в этом процессе по сравнению с циркулирующими фагоцитами, так, у мышей с индуцированной циклофосфамидом нейтропенией элиминация фагов замедлялась лишь в ограниченной степени [112].

Фаговые частицы подвергаются эффективной элиминации ретикуло-эндотелиальной системой. Возможно, однако, отобрать штаммы фагов с измененной структурой поверхностных белков, обладающих значительно увеличенным временем полужизни в крови (для этого может быть достаточно одной аминокислотной замены [117], такие длительно циркулирующие мутанты могут находиться в кровотоке в 1000 и более раз дольше родительского штамма [117–119].

Выделение фагов с мочой было показано неоднократно [104–106, Дарбеева, личное сообщение], однако, по-видимому, этот механизм не имеет решающего значения в процессе элиминации фагов, т.к. концентрации этих вирусов в моче  $10^1$ – $10^2$  [106], суммарное выведение их незначительно. Вместе с тем даже этих незначительных количеств бактериофагов, попадающих в мочевыводящую систему, оказывается достаточно для достижения терапевтического эффекта пероральных препаратов бактериофагов при урологических инфекциях [104]. Логично предположить также, что при повреждении вследствие воспалительного процесса базальной мембраны капилляров почечных клубочков (при пиелонефрите), интенсивность выделения фага увеличится. Возможно также, что попадание фага в мочу связано не только с его фильтрацией в клубочках, но и с переносом из крови через клетки эпителия канальцев. Вопрос о выделении фагов с мочой и факторах, контролирующих этот процесс, нуждается в более тщательном изучении.

Выработка в организме пациентов специфических антител к бактериофагам может препятствовать успеху фаговой терапии. Определенные титры антифаговых антител обнаруживаются также и у здоровых людей и пациентов до фаговой терапии [120]. Однако, по имеющимся на данный момент наблюдениям, присутствие таких антител в крови слабо коррелирует с результатами терапии [A. Gorski, личное сообщение, 2]. Необходимо отметить, что не все антитела, взаимодействующие с фаговой частицей, обладают прямым нейтрализующим действием. Для этого антитела должны взаимодействовать с адгезинами и (у части фагов) некоторыми другими белками хвоста. Выработка специфических высокоаффинных иммуноглобулинов класса IgG требует нескольких недель времени, поэтому при относительно непродолжительных курсах фаготерапии эта проблема не имеет существенного значения. Кроме того, иммуногенность разных фагов существенно различается, для достижения значимого ответа против некоторых бактериофагов требуется применение адьювантов и повторной иммунизации. Нужно также отметить, что количество антигена, содержащегося в терапевтических дозах очищенных бактериофагов, незначительно, так, например,  $10^{10}$  частиц бактериофага T4 содержат только около 1 мкг белка (подсчет основан на том, что массовое содержание ДНК и белка в частицах хвостатых фагов примерно одинаково [121].

## ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФАГОВЫХ ЧАСТИЦ

Непосредственное воздействие некоторых типов фаговых частиц на иммунную систему человека и животных было продемонстрировано в недавних работах группы проф. Gorski. Было показано, что вирусные частицы T-четных бактериофагов уменьшают продукцию активных форм кислорода нейтрофилами, индуцированными бактериями или эндотоксином, супрессируют активацию T-клеток, способствуя толерантности к трансплантатам, а также оказывают некоторое противоопухолевое воздействие [122–124]. Применение бактериофаговых препаратов при лечении различных инфекций, вызванных стафилококками и *E.coli*, часто наблюдалось резкое падение уровня сывороточного C-реактивного белка, являющегося важным маркером воспаления. По-видимому, такое падение не может быть объяснено только антибактериальным эффектом фагов и может быть вызвано иммуномодулирующей активностью фаговых частиц [5].

Было высказано предположение, что связывание частиц фага T4 с эукариотическими клетками опосредовано белком вершин капсида пг 24, который содержит аминокислотный мотив KGD, близкий к мотиву RGD, распознаваемому  $\beta 3$ -интегринами [101]. Это связывание может отчасти обуславливать иммуносупрессорный и противоопухолевый эффект фага T4 *in vivo* и *in vitro* [125]. Мутант фага T4, лишенный декорирующего белка капсида пг 24, имеет более высокую иммунобиологическую активность [125], что, возможно, связано с частичным маскированием этим белком мотива связывания  $\beta 3$ -интегринов. У нескольких фагов обнаружены поверхностные белки, обладающие структурным сходством с молекулами, вовлеченными в сигнальные каскады иммунокомпетентных клеток. Целый ряд структурных белков различных фагов имеет в своем составе иммуноглобулин-подобные [95] или коллаген-подобные домены [126]. В работе [24] было отмечено значительное увеличение концентрации фаговых частиц на изъязвленной слизистой оболочке кишечника и предположили, что иммунологическая активность фаговых частиц может принимать какое-то участие в патологическом процессе при болезни Крона. С другой стороны, предполагается, что природные фаговые популяции могут участвовать в регуляции взаимодействий лимфоидной ткани кишечника и кишечной микрофлоры, в частности, в подавлении воспалительного ответа, вызванного массивным контактом с антигенами [101]. Однако экспериментальные данные, характеризующие взаимодействия естественного вирусного сообщества с иммунной системой, пока отсутствуют.

## ДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ФАГ– БАКТЕРИЯ В ПРОЦЕССЕ ФАГОВОЙ ТЕРАПИИ

Среди медиков и микробиологов, не знакомых близко с теоретическими основами экологии бактериофагов и фаготерапии, распространено мнение, что при появлении даже ограниченного количества фаговых частиц, специфичных к данному штамму возбудителя, в колонизированном бактериями участке тела происходит лавинообразное размножение фагов, продолжающееся до полного истребления бактериальной популяции. Эти взгляды высказываются

даже в ряде методических изданий (ссылки на которые мы не приводим по этическим соображениям). Однако существование фагов и бактерий в одних и тех же экотопах является широко распространенным явлением в природе [10], существующим со времен предшествующих разделению доменов эукариот, бактерий и архей [11]. При этом взаимоотношения бактерий и их вирусов на популяционном уровне далеко не всегда носят антагонистический характер, более того, активность бактериофагов при определенных условиях увеличивает разнообразие и общую метаболическую активность природных бактериальных сообществ [10].

По современным нормам для целей фаговой терапии используются только вирулентные бактериофаги, т.е. такие, размножение которых происходит исключительно в литическом цикле. При этом каждая инфицированная клетка по прошествии определенного промежутка времени, называемого латентным периодом, лизируется, освобождая 50–200, а иногда и более частиц бактериофага. В результате концентрация фаговых частиц может увеличиваться. Однако в реальных системах процессу размножения вируса противостоят процессы разрушения вирусных частиц и их выноса из исследуемой системы. В случае фаговой терапии наибольшее значение имеют поглощение фагов ретикуло-эндотелиальной системой, их секвестр за счет прочной ассоциации с эритроцитами, клетками тканей или межклеточным матриксом, разрушение в результате адсорбции на мертвых или обладающих специфическими системами устойчивости клетках (см. выше), а также вынос из организма с мочой или калом. Немаловажно отметить также, что размножение фагов в большинстве случаев локализовано в очаге инфекции, тогда как рассеяние потомства фагов часто происходит в масштабе всего организма. Если скорость размножения бактериофагов *in situ* превышает скорость их рассеяния и (или) разрушения, то концентрация фагов будет расти до исчерпания доступных клеток хозяев. В этом случае говорят об активной фаговой терапии [127]. Вероятно, именно такой сценарий реализуется при фаготерапии ряда кишечных инфекций, в т.ч. экспериментальных. В этих случаях достаточно одного или нескольких приемов фага, чтобы добиться излечения [2, 6, 7]. В случае же, когда для поддержания концентрации фагов, необходимой для подавления роста бактерий (см. ниже), необходимо введение значительных количеств фага извне, как это бывает при лечении большинства хронических инфекций, можно говорить о пассивной терапии [127]. Во многих реальных ситуациях имеет место сочетание обоих сценариев.

Рассмотрим факторы, которые определяют кинетику взаимодействия популяции бактерий с фагом в процессе терапии. Ключевым событием в литическом цикле бактериофага является адсорбция вирусной частицы на поверхности бактерии, обычно приводящая к введению в клетку вирусной нуклеиновой кислоты (у терапевтически значимых фагов – геномной ДНК). Процесс адсорбции обусловлен высокоспецифичным молекулярным узнаванием фаговыми адгезинами соответствующих рецепторов на поверхности бактериальных клеток [128], которыми обычно являются липополисахариды, поверхностные белки, тейхоевые кислоты, а также компоненты капсул

и другие поверхностные структуры бактерий. Это узнавание представляет собой пассивный физико-химический процесс, зависящий от частоты соударений фаговых частиц и клеток в процессе броуновского движения [129]. Этот процесс подчиняется уравнению кинетики второго порядка, т.е. его скорость зависит от концентрации бактерий и фагов. В частности,  $\ln(P/P_0) = -kct$ , где  $P/P_0$  – доля фаговых частиц, остающихся не адсорбированными к моменту времени  $t$ ,  $C$  – концентрация бактериальных клеток, не меняющаяся в течение времени  $t$ ,  $k$  – константа адсорбции ( $\text{мл}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$ ). При этом все различия в скорости диффузии фага, числе рецепторов на поверхности клеток, ингибирование адсорбции физико-химическими условиями среды и т.д. выражаются в значениях  $k$ , измеряемых для каждого случая эмпирически [129]. В лабораторных условиях в жидких средах большинство хвостатых фагов имеют  $k$  порядка  $(1.5-2.5) \times 10^{-9} \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$ .

Эмпирически было установлено, что для различных систем фаг-хозяин имеется пороговое значение концентрации клеток хозяев, необходимой для «начала размножения» вируса [54], составляющее примерно  $10^4$ . В реальных природных экосистемах (в т.ч. и в организме животного) пороговое значение концентрации хозяев, необходимое для роста фага (МТ), можно определить как такое, при котором за время полувыведения фага  $t_{1/2}$  минус длительность латентного периода  $t_{\text{lat}}$  будет адсорбироваться количество фага, обеспечивающее продукцию потомства, равного половине исходной популяции, т.е. такое значение концентрации клеток  $C$ , при котором  $P_{(t_{1/2}-t_{\text{lat}})} = 0.5P_0/Y$ , где  $Y$  – урожай фага на одну инфицированную клетку в данных условиях (с учетом гибели части инфицированных клеток до освобождения потомства фагов). При превышении этого порогового уровня  $C > \text{МТ}$  скорость продукции фага будет превышать скорость его вывода и разрушения, следовательно, количество его в системе будет увеличиваться.

Существует также пороговое значение концентрации фага  $C_{\text{phage}}$ , при которой происходит подавление роста бактериальной популяции [127]. При этом значении  $C_{\text{phage}}$  (ИТ) половина бактерий окажется инфицирована за время, равное среднему времени генерации (при условии, что в течение этого периода времени концентрация фага остается неизменной). Для быстро растущих бактериальных культур в лаборатории подавление роста происходит при концентрации фага около  $10^7$  [127, 129] БОЕ  $\times \text{мл}^{-1}$ . Эта величина не имеет особенного значения в лабораторной практике, т.к. *in vitro*  $C \gg \text{МТ}$ , а скорость разрушения фаговых частиц пренебрежимо мала, поэтому вирусы быстро накапливаются, вызывая практически полный лизис культуры. Очевидно, что при использовании фаговых препаратов *in vivo* создаются иные соотношения этих процессов, поэтому популяции патогенных бактерий обычно не уничтожаются в ходе фаговой терапии полностью. Скорее, имеет смысл говорить об уменьшении численности патогена до уровня, при котором инфекция может контролироваться иммунной системой [127].

В ситуации реальной фаговой терапии большинство бактериальных популяций колонизируют лишь ограниченные ниши в организме, при этом значительная часть бактерий может находиться в физиологических состояниях, неблагоприятных для размножения фага, например в составе



биопленок [130]. Состояние клеток в биопленках отличается от такового в суспензионной культуре [131], при этом восприимчивость их к инфекции фагами снижается [119, 132]. Отчасти это обусловлено затруднением диффузии фагов в матриксе, который окружает бактериальные клетки в пленках, однако, даже при искусственном инфицировании. Тем не менее бактериофаги способны инфицировать клетки в составе биопленок [132, 133]; некоторые вирусы кодируют ферменты, способные гидролизовать полисахариды матрикса, кроме того, соответствующие гены могут быть введены в геном фага генно-инженерным путем [134]. Немаловажно, что фаговая инфекция вызывает нарушение структуры биопленки, делая оставшиеся там клетки доступными для иммунной системы. Бактериофаги, по-видимому, способны инфицировать и клетки-персистеры [135], которые во многом обуславливают неудачи антибактериальной химиотерапии такого рода инфекций [136]. Пространственная неоднородность структуры биофильмов [131], а также многих микросред в организме человека и животных может приводить, по-видимому, к тому, что волнообразное распространение фаговой инфекции в популяции бактерий самопроизвольно затихает. Ограничивают распространение волны инфекции также мертвые и покоящиеся клетки, способные адсорбировать фаговые частицы. Таким образом, имеет место сочетание активно-пассивного процесса на микроуровне и пассивного – на уровне организма в целом. Этим эффектом можно объяснить успех фаговой терапии ряда инфекций, например синегнойного остеомиелита [М. Кутеталадзе, личное сообщение], при которых применение антибиотиков не достигает своей цели не столько из-за устойчивости возбудителя, сколько из-за специфической локализации инфекции. Хотя проникновение фагов в такие очаги инфекции также затруднено, возможность локальных «вспышек» цепной инфекции определяет, вероятно, успех терапии. Кроме того, покоящиеся клетки с пониженной физиологической активностью, на которых размножения фага не происходит, могут, тем не менее, подвергаться инфекции, которая развивается отсроченно при активации [135, 136]. Таким образом, сочетание активной и пассивной фаговой терапии является наиболее распространенным сценарием при лечении установившихся хронических инфекционных заболеваний. При этом необходимо применение весьма длительных курсов терапии, приводящих, однако, к успешному излечению пациентов [5, 6]. В таких случаях необходимо в течение значительного времени поддерживать концентрацию фага в очаге инфекции за счет его введения извне. При лечении раневых инфекций это может достигаться постановкой дренажей с постоянным притоком фагового препарата в рану или применением препаратов, медленно высвобождающих фаговые частицы, таких как препарат «фагобиодерм», созданный в Тбилиском институте бактериофагов, микробиологии и вирусологии им. Г. Элиавы (Грузия) [137].

Очевидно, что в ходе фаговой терапии возможен отбор фагоустойчивых мутантов бактерий. Интересно, однако, что в доступной нам литературе мы не смогли найти ни одного документированного случая неудачи фаговой терапии из-за развития фагоустойчивых мутантов. Отчасти это может быть связано с тем, что в большинстве случаев такие мутанты имеют нарушенные структуры клеточной

поверхности, которые служат рецепторами соответствующих фагов. Физиологической ценой такой устойчивости является снижение скорости роста [10, 138], способности к колонизации [7, 65, 66, 139, см. также раздел 3.3] и вирулентности [139].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По накапливающимся данным геномики и структурной биологии [11], история сосуществования бактерий и бактериофагов насчитывает более 2 млрд лет. Сформировавшиеся за это время «правила игры» между ними устроены таким образом, что присутствие фагов в природных экосистемах не только не уменьшает разнообразия и общей активности бактерий, а, напротив, существенно увеличивает их [10]. В результате развития биологии и экологии бактериофагов становится все более очевидно, что простая, на первый взгляд, идея использования «естественных врагов» бактерий для борьбы с инфекциями, впервые опробованная на практике 1919 г. Феликсом д'Эрелем и проф. Виктором-Анри Гутинелем (Hutinel) [2], представляет собой нечто вроде шулерского приема, который должен позволить в данных конкретных условиях добиться полного подавления одного игрока – патогенной бактериальной популяции и последующего неизбежного исчезновения второго – популяции бактериофагов. Для рационального (в противовес чисто эмпирическому) решения этой задачи необходимо, прежде всего, ясное понимание упомянутых «правил игры» применительно к экологическим системам, входящим в состав организма животного или человека.

Учет особенностей экологии фагов в этих средах позволяет сформулировать дополнительные требования к терапевтическим фагам, помимо их спектра хозяев и эффективности *in vitro*, что определяет возможные векторы развития фаговой терапии в XXI в. Среди таких перспективных направлений можно упомянуть: 1) усовершенствование технологий подбора терапевтических фагов, в т.ч. разработка и стандартизация быстрых тестов на умеренность – вирулентность, создание систем типирования потенциальных терапевтических фагов для установления их принадлежности к известным группам, а также развитие методологии анализа фаговых геномов для установления их пригодности для терапевтического применения; 2) создание специализированных баз данных и коллекций охарактеризованных терапевтических фагов для быстрого их подбора с целью оперативного формирования индивидуализированных фаговых коктейлей, адаптированных под конкретного пациента; 3) создание методов управления транслокацией и распределением фагов в организме, в т.ч. и обеспечение длительной циркуляции фагов в крови, их проникновения в различные ткани и органы и т.д.; 4) создание методов тестирования способности инфицировать бактерии, находящиеся в различных физиологических состояниях и колонизирующие различные «защищенные» экологические ниши в организме, как, например, резидентные бактериальные популяции в кишечнике, бактерии в составе биопленок и т.д. Разработка методов модификации этих свойств фагов, в т.ч. методами генной инженерии; 5) учет и управление иммунобиологической активностью фагов, а также целенаправленное использование свойства

фаговых частиц взаимодействовать с клетками иммунной системы; б) использование в качестве терапевтических агентов препаратов отдельных белков бактериофагов, в т.ч. фаговых лизинов [140] и бактериоцинов.

Кроме этого, дальнейшие исследования роли бактериофагов в гомеостазе нормальной микрофлоры и в развитии ряда патологических явлений позволят найти новые подходы к терапевтическому воздействию на эти процессы. ●

*Работа лаборатории вирусов микроорганизмов ИНМИ РАН поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК № 02.740.11.0313), РФФИ (грант № 09-04-01482-а), Федеральным агентством по образованию и программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».*  
*Авторы благодарны М. Левиной за критическое прочтение рукописи.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- d'Herelle F. (1921) La bactériophage. Son rôle dans l'immunité. Paris. Cited after Russian edition (1926). Moscow – Leningrad: State Editor.
- Sulakvelidze A., Kutter E. (2005) Bacteriophage therapy in humans. In: Bacteriophages: biology and applications. Eds. Kutter E. and Sulakvelidze, A. P. 381–436. Boca Raton: CRC Press.
- Hawkey P.M., Jones A.M. // J Antimicrob Chemother. 2009. Sep;64 Suppl 1:i3-10.
- Livermore D.M. // J Antimicrob Chemother. 2009 Sep;64 Suppl 1:i29-36.
- Gorski A., Miedzybrodzki R., Borysowski J., et al. // Curr. Opin. Investig. Drugs. 2009.10. P. 766–774.
- O'Flaherty S., Ross R.P., Coffey A. // FEMS Microbiol. Rev. 2009.33, 801.
- Sulakvelidze A. and Barrow P. Phage therapy in animals and agribusiness. In: Bacteriophages: biology and applications. Eds. Kutter E. and Sulakvelidze A. 2005. P. 335–380. Boca Raton: CRC Press.
- Ackermann H.W. 5500 // Arch. Virol. 2007.152. P. 227–243.
- Calendar R. ed. The bacteriophages. 2nd edition, Oxford university press, New York. 2006.746P.
- Weinbauer M. // FEMS Microbiol. Rev. 2004. 28: P. 127–181.
- Bamford D. // Res. in Microbiol. 2003. 154. P. 231–236.
- Домарадский И.В., Хохоев Т.Х., Кондракова О.А. и др. // Российский химический журнал. 2002. 46. С. 80–89.
- Letarov A., Kulikov E. // J. Appl. Microbiol. 2009. 107. С. 1–13.
- Тараканов Б.В. Феномен бактериофагии в рубце жвачных. М.: Научный мир. 2006. 184с.
- Куликов Е.Е., Исаева А.С., Роткина А.С., Манькин А.А., Летаров А.В. // Микробиология. 2007. 76. С. 271–278.
- Тараканов Б.В. // Микробиология. 1971. 40. С. 544–550.
- Тараканов Б.В. // Микробиология. 1971. 41. С. 862–870.
- Alexander F., Davies M. E., Muir A. R. // Res Vet Sci 1970.11. P. 592–593.
- Breitbart M., I. Hewson B., Felts J, et al. // J. Bacteriol. 2003. 185. P. 6220–6223.
- Cann J. A., Fandrich S. E., Heaphy S. // Virus genes 2005. 30. P. 151–156.
- Flewett T.H., Bryden A.S., Davies H. // J. Clin. Path. 1974. 27. P. 603–614.
- Hoogenraad N.J., Hird F.J.R. // Aust. J. Biol. Sci. 1970. 23. P. 793–808.
- Hoogenraad N.J., Hird F.J.R., Holmes I., Millis F. // J. Gen. Virol. 1967. 1. P. 575–576, 942–943.
- Lepage P., Colombet J., Marteau P. et al. // Gut 57. 2008. P. 424–425.
- Paynter M.J.B., Ewert D.L., Chalupa W. (1969) // Applied Microbiol. 1969. 18. P. 942–943.
- Ritchie A.E., Robinson I.M., Allison M.J. Rumen bacteriophage: survey of morphological types. In: Microscopie electronique, ed Favard P. 1970. Vol. 3. P. 333–334. Paris: Societe Francaise de Microscopie electronique (cited by Tarakanov, 2006).
- Zhang T., Breitbart M., Heng Lee W. et al. // PLoS Biol. 2006. 4(1): e3C3.
- Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M. et al. // Science. 321. 2008. P. 960–964.
- Hitch G., Pratten J., Taylor P.W. // Lett in Applied Microbiol. 2004. 39. P. 215–219.
- Comeau A.M., Buenaventura E., Suttle C.A. // Appl. Env. Microbiol. 2005. 71. P. 5324–5331.
- Klieve A.V. // Appl. Environ. Microbiol. 1991. 57. P. 3660–3663.
- Calci K.R., Burkhardt IIIW., Watkins W.D., Scott. R.R. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. 64. P. 5027–5029.
- Cole D., Long S.C., Sobsey M. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. 69. P. 6507–6514.
- Cornax R., Morinigo M.A., Gonzalez-Jaen F., Alonso M.C., Borrego J.J. // Zentralbl Bakteriol. 1994. 281. P. 214–224.
- Dhillon T.S., Dhillon E.K., Chau H.C., Li W.K., Tsang A.H. // Appl. Environ. Microbiol. 1976. 32. P. 68–74.
- Furuse K., Osawa J., Kawashiro R. et al. (1983) // J. Gen. Virol. 1983. 64. P. 2039–2043.
- Gantzer C., Henny J., Schwartzbrod L. // Int. J. Hyg. Environ. Health. 2002. 205. P. 325–328.
- Grabow W.O.K., T.E. Neubrech C.S Holzrhausen and Jofre. J. // Water Science and Technology. 1995. 31. P. 223–230.
- Havelaar A.H., Furuse K., Hogeboom W.M. // J. Appl. Bacteriol. 1986. 60. P. 55–262.
- Lusiak-Szelachowska M., Weber-Dabrowska B., Gorski A. // Pol. Merkur. Lekarski. 2006. 124. P. 381–383.
- Muniesa M., Moce-Llivina L., Katayama H., Jofre J. // Antonie Van Leeuwenhoek. 2003. 83. P. 305–315.
- Schaper M., Jofre J., Uys M., Grabow W. O. K. // J. Appl. Microbiol. 2002. 92. P. 657–667.
- Schmid E. N., von Recklinghausen G., Ansorg. R. // J. Med. Microbiol. 1990. 32. P. 101–104.
- Klieve A.V., Swain R.A. // Appl. Environ. Microbiol. 59. P. 2299–2303.
- Swain R.A., Nolan J.V., Klieve A.V. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. 62. P. 994–997.
- Furuse K., Sakurai T., Hirashima A., Katsuki M., Ando A., Watanbee I. // Appl. Environ. Microbiol. 1978. 35. P. 995–1002.
- Chibani-Chenoufi S., Sidoti J., Bruttin A. et al. // J. Bacteriol. 2004. 186. P. 8287–8294.
- Ricca D.M., Cooney J.J. // J. Indust. Microbiol. Biotechnol. 2000. 24. P. 124–126.
- Golomidova A., Kulikov E., Isaeva A., Manykin A., Letarov A. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. 73. P. 5975–5981.
- Hintz H.F., Cymbaluk N.F. // Annu Rev. Nutr. 1994. 14. P. 243–267.
- Yoshida T., Ellner S.P., Jones L.E. et al. // PLoS. Biol. 2007. 5. P. 1868–1879.
- Stephen A. M., Cummings J. H. // J. Med. Microbiol. 1980. 13. P. 45–56.
- Iverson W. G., Mills N. F. // Appl. Environ. Microbiol. 1977. 33. P. 810–813.
- Wiggins B.A., Alexander M. // Appl. Environ. Microbiol. 1985. 48. P. 19–23.
- Brokhurst M.A., Buckling A., Rainey P.B. // Proc. R Soc. 2005. B 272. P. 1385–1391.
- Holmfeldt K., Middelboe M., Nybroe O., Riemann L. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. 73. P. 6730–6739.
- Poullain V., Gandon S., Brokhurst M.A., Buckling A., Hochberg M.E. // Evolution. 2008. 62(1). 1–11.
- Weitz J.S., Hatman H., Levin S.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. 102. P. 9535–9540.
- Hoskisson P., Smith M.C.M. // Curr. Opin. Microbiol. 2007. 10. P. 396–400.
- Pal C., Macia M., Oliver A., Schachar I., Buckling A. // Nature. 2009. 450. P. 1079–1081.
- Sundin G.W., Weingard M.R. // FEMS Microbiol. Let. 2007. 277. P. 11–20.
- LeClerc J.E., Li B., Payne W.L., Cebula T.A. // Science. 1996. 274. P. 1208–1211.
- Milinoich G.J., Trott D.J., Burrell P.C. et al. // Environ. Microbiol. 2006. 8. P. 885–898.
- Atterbury R. J., Dillon E., Swift C., et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. 71. P. 4885–4887.
- Scott A.E., Timms A.R., Connerton P.L., El-Shibiny A., Connerton I.F. // Environ. Microbiol. 9. P. 2341–2353.
- Scott A.E., Timms A.R., Connerton P.L. et al. // Plos. Biology. 2007. 3. P. 114.
- Brussow H. // Microbiology. 2005. 151. P. 2133–2140.
- Chibani-Chenoufi S., Sidoti J., Bruttin A. et al. // Antimicrob. Agents. Chemotherapy. 2004. 48. P. 2558–2569.
- Kasman L. // Virology. 2. P. 34.
- Gabig M., Herman-Antosiewicz A., Kwiatkowska M. et al. // Microbiology. 2002. 148. P. 1533–1542.
- Araujo R., Muniesa M., Méndez J. et al. // J. Virol. Meth. 2001. 93. P. 127–136.
- Poulsen L.K., Licht T.R., Rang C., Krogfelt K.A., Molin S. // J. Bacteriol. 1995. 177:5840–5845.
- Krogfelt K.A., Poulsen L.K., Molin S. // Infect. Immun. 1993. 61. P. 5029–5034.
- Stryiak I., Kmet V., Spanova A. // Microbiologica. 1989. 12. P. 317–322.
- Swain R.A., Nolan J.V., Klieve A.V. // Microbiology Australia. 1996. 17. A87(GWP:27).
- Wells J.E., Russel J.B. // J. Dairy Sci. 1996. 79. P. 1487–1495.
- Antonio M.A.D., Hawes S.E., Hillier S.L. // The J. Inf. Diseases. 1999. 180. P. 1950–1956.
- Antonio M.A.D., Hillier S.L. // J. Clin. Microbiol. 2003. 41. P. 1881–1887.
- Kiliç A.O., Pavlova S. I., Alpaya S., Kiliç S.S., Tao L. (2001) // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001. 8. P. 31–39.
- Martin R., Sobeyrn N., Escobedo S., Suarez J. // Int. Microbiol. 2009. 12. P. 131–136.
- Blackwell A.L. // Sex Transm. Infect. 1999. 75. P. 352–353.
- Fethers K.A., Fairley C.K., Hocking J.S., Gurrin L.C., Bradshaw C.S. // Clin. Infect. Dis. 2008. 47. P. 1426–1435.
- Brown S.P., Le Chat L., De Paepe M., Taddei F. // Curr. Biol. 2006. 16. P. 2048–2052.
- Kihara A., Akiyama Y., Ito K. (2001) // J. Biol. Chem. 2001. 276. P. 13695–13700.

85. Riipinen K.A., Raisanen L., Alatosava T. // *J. Appl. Microbiol.* 2007. 103. P. 2465–2475.
86. Pavlova S.I., Tao L. // *Mutat. Res.* 2000. 466. P. 57–62.
87. Tock M.R., Dryden D.T. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2005. 8. P. 466–472.
88. Durmaz E., Klaenhammer T.R. // *J. Bacteriol.* 2007. 189. P. 1417–1425.
89. Fineran P.C., Blower T.R., Foulds L.J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2009. 106. P. 894–899.
90. Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. 6. P. 181–186.
91. Hale C.R., Zhao P., Olson S. et al. // *Cell.* 2009. 139. P. 945–956.
92. Wiedenheft B., Zhou K., Jinek M., Coyle S.M., Ma W., Doudna J.A. // *Structure.* 2009. 17. P. 904–912.
93. Bystrycky V., Drahos V., Mulczyk M., Przondo-Hessek A., Slopeck S. // *Acta Virol.* 1964. 176. P. 369–372.
94. Dennehy J.J., Friedenbergh N.A., Yang Y.W., Turner P.E. // *Ecol.Lett.* 2007. 10. P. 230–240.
95. Fraser J.S., Maxwell K.L., Davidson A.R. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2007. 10. P. 382–387.
96. Letarov A., Manival X., Desplats C., Krisch H.M. // *J. Bacteriol.* 2005. 187. P. 1055–1066.
97. Gallet R., Shao Y., Wang I. // *BMC Evolutionary Biology.* 2009. 9:241.
98. Dhillon E.K.S., Dhillon T.S., Lam Y.Y., Tsang A.H.C. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1980. 39. P. 1046–1053.
99. Miller R.V., Day M. Contribution of lysogeny, pseudolysogeny, and starvation to phage ecology. In S. T. Abedon (ed): *Bacteriophage Ecology.* Cambridge U. Press, Cambridge. 2008. P. 114–143.
100. Dabrowska K., Switala-Jelen K., Opolski A., Weber-Dabrowska B. Gorski A. // *J. Applied Microbiol.* 2005. 98. P. 7–13.
101. Gorski A., Wazna E., Weber-Dabrowska B., Dabrowska K., Switala-Jelen K., Miedzybrodzki R. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006. 46. P. 313–319.
102. Olivera A., Sereno R., Nicolau A., Azeredo J. // *Poultry Sci.* 2009. 88. P. 728–733.
103. Боговазова Г.Г., Ворошилова Н.Н., Бондаренко В.М. // *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* 1991. № 4. P. 5–8.
104. Перепанова Т.С., Дарбеева О.С., Котлярова Г.А. и др. // *Урология и нефрология.* № 5. С. 14–17.
105. Субботин А.В., Функер М.Г., Урман Э.С. и др. Применение секстафага в комплексной антибактериальной терапии инфицированного панкреонекроза. Здоровье и образование: Материалы междунар. научно-практич. конф. Пермь, 2006. С. 191–197.
106. Токарев М.В., Давидов М.И., Функер Е.В. Лечение острого пиелонефрита бактериофагами. Актуальные вопросы клинической медицины. Сборник научных трудов, посвященный 130-летию Пермской ГРБ № 6. Пермь. 2005.
107. Constantini T.V., Putnam J.G., Sawada R. et al. // *Surgery.* 2009. 146. P. 206–212.
108. Duerr D.M., White S.J., Shluesener H.J. // *J. Virol. Methods.* 2004. 116. P. 177–180.
109. Higgins L.M., Lambkin I., Donnelly G. et al. // *Pharm. Res.* 2004. 21. P. 695–705.
110. Kang S.K., Woo J.H., Kim M.K., Woo S.S., Choi J.H., Lee N.K., Choi Y.J. // *J. Biotechnol.* 2009. 135. P. 210–216.
111. Hamzeh-Mivehroud M., Mahmoudpour A., Rezazadeh H., Dastmalchi S. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008. 70. P. 577–581.
112. Uchiyama J., Maeda Y., Takemura I. et al. // *Microbiol. Immunol.* 2009. 53. P. 301–304.
113. Dubos R., Straus J.H., Pierce C. // *J. Exp. Med.* 1943. 20. P. 161–168.
114. Raynaud A., Cloastre J.H., Bernard J. et al. // *Vet. Microbiol.* 1992. 30. P. 203–212.
115. Inchley C.J. // *Clin. Exp. Immunol.* 1969. 5. P. 173–187.
116. Appelmans R. Le bacteriophage dans l'organisme. *Compt. Rend. Soc. de Biol.* 1921. 85. P. 722–724.
117. Vitiello C.L., Merrill C.R., Adhya S. // *Virus. Res.* 2005. 114. P. 101–103.
118. Capparelli R., Parlato M., Borriello G., Salvatore P., Iannelli D. // *Antimicrobiol. Agents Chemother.* 2007. 51. P. 2765–2773.
119. Capparelli R., Ventimiglia S., Roperto S., Fenizia D., Iannelli D. // *Clin. Microbiol. Infect.* 12. P. 248–253.
120. Kucharewicz-Krukowska A., Slopeck S. // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 1987. 35. P. 553–561.
121. Адаме М. Бактериофаги. М.: Изд-во иностр. лит. 1961. 527 с.
122. Miedzybrodzki R., Switala-Jelen K., Fortuna W. et al. // *Virus. Res.* 2008. 131. P. 233–242.
123. Pajtasz-Piasecka E., Rossowska J., Dus D., Weber-Dabrowska B. et al. (2008) // *Immunol. Lett.* 2008. 116. P. 24–32.
124. Przerwa A., Zimecki M., Switala-Jelen K. et al. // *Med. Microbiol. Immunol.* 2006. 195. P. 143–150.
125. Dabrowska K., Zembala M., Boratynski J. et al. // *Arch. Microbiol.* 2007. 187. P. 489–498.
126. Rasmussen M., Jacobson M., Bjork L. // *The J. Biol. Chem.* 2003. 278. P. 32313–32316.
127. Cairns B., Timms A.R., Jansen V.A.A., Connerton I.F., Payne R.J.H. // *PLoS Pathog.* 2009. 5(1): e1000253. doi:10.1371/journal.ppat.1000253.
128. Vinga I., Sao-Jose C., Tavares P., Santos M. Bacteriophage entry in the host cell. In *Modern bacteriophage biology and biotechnology.* Wegrzyn G. ed. Research signpost, Kerala, India. 2006.
129. Kasman L., Kasman A., Westwater C., Dolan J., Schmidt M.G., Norris J.S. // *J. Virol.* 2002. 76. P. 5557–5564.
130. Macfarlane S., Dillon J.F. // *J. Appl. Microbiol.* 2007. 102. P. 1187–1196.
131. Anderson G.G., O'Toole G.A. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008. 322. P. 85–105.
132. Azeredo J., Sutherland I.W. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008. 9. P. 261–266.
133. Cerca N., Olivera R., Azeredo J. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2007. 45. P. 313–317.
134. Lu T.K., Collins J.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. 104. P. 11197–11202.
135. Pearl S., Gabay C., Kishony R., Oppenheim A., Balaban N. // *PLoS Biol.* 2008. 6(5): e120. doi:10.1371/journal.pbio.0060120.
136. Lewis K. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008. 322. P. 107–131.
137. Jikia D., Chkhaidze N., Imedashvili E. et al. *Clin. Exp. Dermatol.* 2005. 30. P. 23–26.
138. Bohannon B.J.M., Lenski R.E. // *Ecology Lett.* 3. P. 362–377.
139. Fischetti V.A. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2008. 11. P. 393–400.
140. Smith H.W., Huggins M.B. // *J. Gen. Microbiol.* 1983. 133. P. 1111–1126.



УДК 577.352.465

# Система кальциевой сигнализации при нейродегенерации

И.Б. Безпрозванный

Юго-Западный медицинский центр университета штата Техас, Даллас, Техас, США  
 Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4  
 E-mail: Ilya.Bezprozvanny@UTSouthwestern.edu

**РЕФЕРАТ** Нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП), амиотропный латеральный склероз (АЛС), болезнь Хантингтона (БХ) и спинномозжечковые атаксии (СМА) представляют собой важнейшую проблему как с точки зрения фундаментальной науки, так и с позиций практической медицины. Несмотря на интенсивные исследования причин этих заболеваний, клинические исследования имеют очень скромный прогресс, и до сих пор не существует лечения ни для одного из них. Одной из основных преград к разработке методов лечения этих заболеваний является отсутствие ясного понимания их этиологии и патофизиологии. В данном обзоре приведено обсуждение результатов в поддержку «Кальциевой гипотезы нейродегенеративных заболеваний». Кальциевая гипотеза постулирует, что атрофические и дегенеративные процессы в нейронах больных БА, БП, АЛС, БХ, и СМА сопровождаются изменениями кальциевого гомеостаза. Более того, кальциевая гипотеза постулирует, что нарушения кальциевой сигнализации являются одним из ключевых и ранних процессов, приводящих к развитию патологии при этих заболеваниях. На основании обсужденных результатов делается вывод, что кальциевые каналы и другие белки, вовлеченные в нейрональную кальциевую сигнализацию, являются потенциальными белками-мишенями для разработки лекарственных препаратов для лечения БА, БП, АЛС, БХ, и СМА.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, амиотропный латеральный склероз, болезнь Хантингтона, спинномозжечковые атаксии, кальциевые каналы, кальциевая сигнализация, митохондрии, трансгенные мыши, клинические испытания, имаджинг, мемантин, димебон, рилузол.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** эндоплазматический ретикулум (ЭР), митохондриальный  $\text{Ca}^{2+}$  переносчик (MCU), болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП), амиотропный латеральный склероз (АЛС), болезнь Хантингтона (БХ), спинномозжечковые атаксии (СМА), белок Хантингтина (Хтт), N-methyl-D-aspartate receptors NMDAR, срединные шипиковые нейроны (СПН), тетрабеназин (TBZ), наследственная болезнь Альцгеймера НБА, фосфатидилсерина (PtdS).

**К**альциевая сигнализация в нейронах связывает мембранную возбудимость и клеточные биологические функции [1]. Поскольку  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы существуют на границе между «электрическим» и «сигнальным» мирами, они играют ключевую роль в различных аспектах нейрональной функции.  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализация необходима для кратковременной и долговременной синаптической пластичности. Из-за ее огромной важности нейроны используют многочисленные способы управления концентрацией внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , чаще всего в пределах местных сигнальных микродоменов.

## НЕЙРОНАЛЬНАЯ $\text{Ca}^{2+}$ -СИГНАЛИЗАЦИЯ

В нейрональную  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализацию вовлекается большое количество  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов: потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы плазматической мембраны (VGCC), NMDA-рецепторы, AMPA-рецепторы, TRP-каналы и деполуправляемые каналы. Высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо эндоплазматического ретикулума (ЭР) осуществляется рецепторами инозитол-1,4,5-трисфосфата

(InsP<sub>3</sub>R) и рианодиновыми рецепторами (RyanR). Помпа SERCA в ЭР,  $\text{Ca}^{2+}$  помпа плазматической мембраны и  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обменник плазматической мембраны контролируют концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле в узком диапазоне значений. В формировании цитозольных  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов важную роль играют митохондрии. Митохондриальный  $\text{Ca}^{2+}$ -переносчик (MCU) является ионным каналом, который вовлекается в мощный и быстрый вход кальция в митохондрии. Большое количество  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков вовлечено в поддержание определенного уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле (такие как кальбандин-D28, кальретинин и парвальбумин) и в просвете ЭР (такие как кальретикулин и кальнексин) нейронов.

Поскольку нейроны чрезвычайно чувствительны к изменениям внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , они используют целый ряд  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых структур, включая белки, вовлеченные в слияние синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной (например, синаптогамины),  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые киназы и фосфатазы (например,  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  киназа и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая фосфатаза кальци-

Таблица 1. Нейродегенеративные заболевания (Bezprozvanny, 2009)

Забол.	Затронутые нейроны	Возраст начала болезни	Спор/насл.	Гены	Препараты	Мишень воздействия	Эффект
БА	Нейроны коры и гиппокампа	> 65	95 % спор 5 % насл.	APP PSEN1 PSEN2	Наменда (Мемантин)	блокада NMDA- рецепторов, снижение токсичности	Умеренные улучшения когнитивной функции
					Донепезил (Арицепт), Галантамин (Разадин), Ривастигмин(Экселон)	Ингибиторы ацетилхолинэстеразы. Увеличение концентрации ацетилхолина в мозге	Умеренные улучшения когнитивной функции
БП	Допамиnergические нейроны pars compacta черного вещества	>65	95 % спор 5 % насл.	Synuc1 LRRK2 Parkin PINK1 DJ-1	L-Dopa (Леводопа)	Увеличение содержания допамина в нейронах черного вещества	Симптоматическое облегчение
БАС	Моторные нейроны	40–60	95 % спор 5 % насл.	SOD1	Рилузол (Рилутек)	Антиглутаматное действие (активатор захвата глутамата, блокада рецептора NMDAR и Na <sup>+</sup> - каналов)	Увеличивает продолжительность жизни на несколько месяцев
БХ	Срединные шипиковые нейроны стриатума	40–50	100 % насл.	Huntingtin	Тетрабеназин (Ксеназин)	Антидопаминное действие (ингибитор VMAT, снижает количество выделяемого допамина)	Уменьшение хореи
СМА	Различные области мозга, вовлеченные в контроль моторики	40–50	100 % насл.	Ataxins	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

нейрин), Ca<sup>2+</sup>-зависимые сигнальные энзимы (например, Ca<sup>2+</sup>-зависимые аденилат циклаза и Ca<sup>2+</sup>-зависимая NO-синтаза) и Ca<sup>2+</sup>-зависимые транскрипционные факторы (например, цАМФ-зависимый элемент-связывающий белок, кальцинейрин В-управляемый ядерный фактор активированных Т лимфоцитов и Ca<sup>2+</sup>-связывающий нисходящий регуляторный элементарный модулятор). Такое многообразие Ca<sup>2+</sup>-зависимых элементов обеспечивает возможность тонкой Ca<sup>2+</sup>-зависимой регуляции нейрональных функций во временной шкале, варьирующей от микросекунд (как в случае с Ca<sup>2+</sup>-зависимым слиянием синаптического пузырька с пресинаптической мембраной) до секунд и минут (как в случае с Ca<sup>2+</sup>-зависимым фосфорилированием и дефосфорилированием) и до дней и даже лет (как в случае с Ca<sup>2+</sup>-зависимыми изменениями в нейрональной экспрессии генов). Эти Ca<sup>2+</sup>-зависимые процессы ведут к кратковременным и долговременным изменениям возбудимости нейронов (посредством изменения активности ионных каналов и характера экспрессии) и к изменениям синаптической передачи (посредством модификации синаптической машинерии и облегчения формирования или разобщения синаптических связей). Вследствие чрезвычайной чувствительности нейронов к изменениям Ca<sup>2+</sup>-сигналов даже сравнительно тонкие дефекты и нарушения Ca<sup>2+</sup>-сигнализации могут со временем привести к разрушительным последствиям [2].

**Ca<sup>2+</sup>-БЛОКАТОРЫ И КОМБИНИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ**

Нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП), амиотропный латеральный склероз (АЛС), болезнь Хантингтона (БХ) и спинномозжечковые атаксии (СМА), представляют собой

важнейшую проблему как с точки зрения фундаментальной науки, так и с позиций практической медицины. Несмотря на интенсивные исследования причин этих заболеваний, клинические исследования имеют очень скромный прогресс, и до сих пор не существует лечения ни для одного из них. Лекарственные препараты, используемые для коррекции указанных нарушений, имеют ограниченный эффект, принося только временное облегчение в проявлении симптомов болезни или несколько задерживая процесс развития заболевания (табл. 1). Основной прогресс в понимании этих нарушений был связан с установлением мутаций, вызывающих патологические процессы. БХ и СМА являются типичными генетическими нарушениями, и гены, ответственные за развитие этих заболеваний, были клонированы 15 лет назад (табл. 1). Большинство случаев БА, БП и АЛС являются спорадическими, но примерно у 5 % пациентов болезнь обусловлена наследственными причинами. Большая часть генов, ответственных за развитие наследственных форм этих заболеваний, клонирована (табл. 1). Изучение генов, вызывающих указанные болезни, позволило сформулировать механистическую гипотезу развития патологических процессов и создать мышиную модель для исследования этих патологий.

Львиная доля попыток изучения указанных патологий сфокусирована на определении основных причин рассматриваемых заболеваний и на развитии путей воздействия на них. Например, основной причиной развития БА считалось накопление амилоида. Поэтому основные усилия исследователей были направлены на предотвращение аккумуляции амилоида путем блокирования его продукции или путем облегчения его вывода из головного мозга. В случае с БХ главной причиной заболевания является экспрессия мутантной формы белка хантингтина (ХтТ).

Соответственно, основные усилия экспериментаторов в данном случае были направлены на попытки снижения экспрессии мутантного Хтт в головном мозге (например, применяя интерференцию антисмысловой РНК или нокдаун). Несмотря на блестящие научные результаты, эти подходы очень трудно перенести в клинику. Так, в случае с БА, клинические испытания амилоид-связывающего соединения трамипросата (Альцгемерд) и ингибитора  $\gamma$ -секретазы таренфлурбила (Флуризан) потерпели неудачу. А клинические испытания амилоид-связывающих моноклональных антител (Бапинеузумаб) имели очень ограниченный эффект. Для клинических испытаний подходов в лечении БХ узким местом является создание адекватной системы доставки иРНК или антисмысловой последовательности РНК в головной мозг человека. Пока нет решения этой проблемы, данные клинические испытания не могут быть начаты.

В то время как фокусирование внимания на амилоиде и мутантном Хтт имеет смысл для развития подходов в лечении БА и БХ, следует отметить, что информация, накопленная к настоящему времени, указывает на то, что это очень трудные цели для воздействия, а разработка успешной терапии, основанной на этих подходах, займет значительное время и потребует больших усилий. Вдобавок к развитию методов лечения мы можем предложить терапию, которая позволит отложить возраст проявления симптомов и/или снизит степень проявления заболевания. В данном обзоре мне хотелось бы сфокусировать внимание на идее о том, что белки, вовлеченные в кальциевую сигнализацию в нейронах, представляют собой притягательную цель для развития терапии «отсрочки начала болезни» для нейродегенеративных патологий. Мы считаем, что в клинике наиболее перспективным будет использование комбинации определенных для каждой болезни терапевтических подходов (таких как «амилоид-направленная» терапия при БА или «хантингтин-направленная» терапия при БХ) и блокаторов  $\text{Ca}^{2+}$ .

### НЕЙРОНАЛЬНАЯ $\text{Ca}^{2+}$ -СИГНАЛИЗАЦИЯ И СТАРЕНИЕ

Наши нейроны одного с нами возраста. Поэтому не удивительно, что риск развития нейродегенеративных заболеваний увеличивается с возрастом (табл. 1). Сравнительные исследования нейронов молодых и старых грызунов показали, что нейрональный аппарат  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации подвергается значительным возрастным изменениям. Этот предмет интенсивно освещался в научной печати [2]. Недавно была предложена интегральная модель зависимых от возраста изменений в обороте гиппокампального  $\text{Ca}^{2+}$  [3]. Основным свойством стареющих нейронов является увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  через усиление высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо через  $\text{InsP}_3\text{R}$  и  $\text{RyanR}$ , усиление входа  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{VGCC}$  L-типа, увеличение медленной следовой гиперполяризации вследствие активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых  $\text{K}^+$  каналов, уменьшение вклада  $\text{NMDAR}$ -опосредованного входа  $\text{Ca}^{2+}$ , уменьшение буферной способности цитозоля и активация кальциейрина и кальпаинов. Такие изменения в нейрональной  $\text{Ca}^{2+}$ -динамике приводят к усилению восприимчивости к индукции долгосрочной депрессии и к увеличению пороговой частоты для запуска долгосрочной потенциации в стареющих нейронах [4]. Ра-

нее обсуждалось значение этих изменений для возрастных нарушений функций памяти [4].

Механизмы, ответственные за возрастные изменения в нейрональной  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации, до сих пор до конца не понятны. Одно из возможных объяснений связано с возрастными дефектами в митохондриальной функции из-за совокупного окислительного повреждения митохондрий. Митохондрии стареющих нейронов деполяризованы и менее эффективно способны управлять входом  $\text{Ca}^{2+}$  [2]. Были обнаружены возрастные изменения транскрипции генов белков  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации [2]. Некоторые из этих изменений напрямую зависят от процесса старения, некоторые являются компенсаторными, но в целом картина согласуется с наличием возрастных изменений в нейрональной  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации на самых разных уровнях.

### НЕЙРОНАЛЬНАЯ $\text{Ca}^{2+}$ -СИГНАЛИЗАЦИЯ И БОЛЕЗНЬ ХАНТИНГТОНА

Болезнь Хантингтона (БХ) – это генетическое нарушение, которое вызывается одиночной мутацией: увеличение  $\text{CAG}$  (полиглутаминового) повтора в гене хантингтина (Хтт) [5] (табл. 1). Больше всего при БХ повреждаются срединные шипиковые нейроны (СПН) стриатума. Большинство исследователей согласны с мнением о том, что мутантный белок  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  приобретает «новую токсическую функцию» [6]. Дестабилизация нейрональной  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации является одной из токсических функций белка  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$ . Исследования мозга пациентов с БХ, а также модельные эксперименты на мышах показали, что в мозгу происходят последовательные изменения уровней экспрессии белков  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации [7]. Нами была предложена «Кальциевая гипотеза БХ» [8].

Существует несколько основных путей влияния  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  на  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализацию в СПН (рис. 1). В нашей лаборатории установлено, что  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  напрямую и специфично связывается с  $\text{C-концом InsP}_3\text{R1}$  [9]. Ассоциация  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  с  $\text{InsP}_3\text{R1}$  была независимо от нас подтверждена [10]. Связывание с  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  увеличивает аффинность  $\text{InsP}_3\text{R1}$  к  $\text{InsP}_3$  [9]. Ключевое значение активации  $\text{InsP}_3\text{R1}$  для нейротоксичности  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  было подтверждено в экспериментах на культуре СПН мышей, служивших моделью БХ [11, 12], а также в генетических экспериментах на модели БХ, на основе *Drosophila* [10]. Мы показали, что вирусная доставка пептида, который разрушает связь между  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  и  $\text{InsP}_3\text{R1}$ , оказывает защитное действие на СПН стриатума в модели БХ на основе мышей в условиях *in vitro* и *in vivo* [13]. Эти данные подтверждают значение усиления активности  $\text{InsP}_3\text{R1}$  в патогенезе БХ.

Экспрессия  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  вызывает усиление активности  $\text{NR2B}$ -содержащего  $\text{NMDA}$ -рецептора [14]. Увеличение токов через  $\text{NMDA}$ -рецептор является следствием действия  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  на транспорт  $\text{NMDA}$ -рецептора к плазматической мембране [15]. СПН стриатума, экспрессирующие  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$ , чувствительны к  $\text{NMDAR}$ -опосредованной токсичности. Фармакологическое ингибирование  $\text{NMDA}$ -рецептора оказывает нейропротективный эффект на культуры СПН мышей – моделей БХ [11, 16]. И мемантин, и рилузол в наших исследованиях оказывали нейропротективное действие на культуры СПН с БХ. Причем мемантин был более эффективным [17]. Мемантин продемонстрировал некото-

рые благоприятные эффекты в рамках мелкомасштабной экспериментальной оценки этого препарата у пациентов с БХ [18], и скоро он будет проходить четвертую фазу клинических испытаний терапии БХ (табл. 2). Рилузол прошел третью фазу клинических испытаний на больных БХ, но это исследование не было успешным [19] (табл. 2).

В дополнение к  $\text{InsP}_3\text{R1}$  и NMDA-рецептору,  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  также способен воздействовать на функцию потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (VGCC). Хантингтин напрямую связывается с  $\alpha_3/\delta$  вспомогательной субъединицей VGCC [10] и с  $\text{Ca}_v2.2$  порообразующей субъединицей VGCC N-типа [20]. Генетическое удаление *Dmca1D* (пороформирующей субъединицы кальциевого канала L-типа *Drosophila*) снижает нейродегенерацию фоторецептора у плодовых мушек-моделей БХ [21]. Электрофизиологический анализ нейронов стриатума мышей-моделей БХ выявил первоначальное увеличение плотности VGCC каналов, которое затем сменялось снижением их плотности [22].

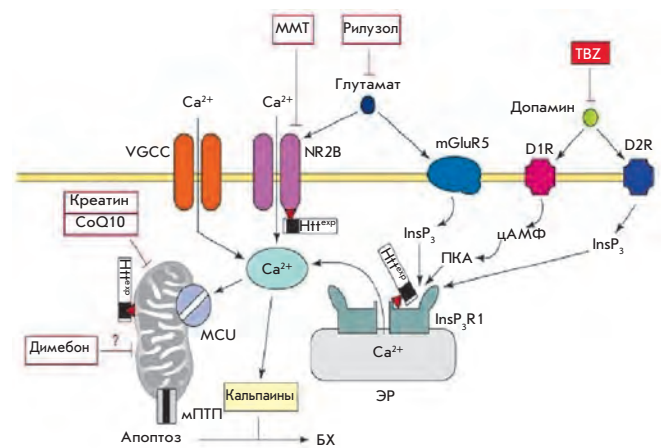
Как и в случае с другими нейродегенеративными нарушениями, механизм токсичности  $\text{Ca}^{2+}$  при БХ вероятно всего опосредуется активацией кальпаинов и избыточным накоплением  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях (рис. 1). Активация кальпаинов наблюдается и при БХ, а кальпаин-опосредованное расщепление  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  и NMDA-рецептора играет ключевую роль в патологии этого заболевания [23–25]. Множество данных также указывает на дисфункцию митохондрий при БХ [26]. Митохондрии, изолированные из лимфоцитов пациентов с БХ и из мозга трансгенных БХ мышей, демонстрировали ярко выраженные дефекты кальциевой регуляции [27]. Митохондриальная функция была нарушена и в клеточных моделях БХ [11, 12, 16, 28]. В дополнение к действию на митохондрии, проистекающему из влияния на последние чрезмерной концентрации цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  также может оказывать влияние на эти органеллы посредством прямого связывания с их наружной мембраной [27] (рис. 1). Необходимо отметить, что клинически адекватные ингибиторы проницаемости мембраны митохондрии демонстрировали нейропротективный эффект как на клеточных моделях БХ, так и на животных моделях этого заболевания [11, 28].

Первым лекарственным препаратом, одобренным в 2008 г. в США для лечения БХ, явился антагонист допамина тетрабенезин (TBZ) (табл. 1). TBZ – это мощный ингибитор везикулярного транспортера моноаминов, который вызывает опустошение допаминового содержимого из пресинаптических везикул. В клинических испытаниях установлено, что TBZ достоверно снижал симптомы хореи у пациентов с БХ [29]. Наша лаборатория исследовала эффекты TBZ на мышах – моделях БХ. Показано, что воздействие этого препарата на ранних стадиях развития болезни снимает дефицит моторной координации и защищает нейроны стриатума от дегенерации [30]. Было сделано заключение о том, что допамин и глутамат действуют синергично для формирования  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов в нейронах стриатума и что нейропротективные эффекты TBZ могут быть объяснены снижением  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации [30]. (рис. 1). Эти факты подтверждают, что TBZ может использоваться не только как препарат для симптоматического лечения на поздних стадиях заболевания, но и как препарат для предсимптомной терапии. Однако у некоторых пациентов TBZ вызывал

сильную депрессию [29], поэтому необходим поиск других антагонистов допамина в качестве альтернативы TBZ. Например, допамин-специфичный ингибитор везикулярного транспортера моноаминов или блокаторы D1 и D2 рецепторов.

### НЕЙРОНАЛЬНАЯ $\text{Ca}^{2+}$ -СИГНАЛИЗАЦИЯ И СПИННОМОЗЖЕЧКОВЫЕ АТАКСИИ

Как и в случае с БХ, спинномозжечковые атаксии (СМА) являются аутосомальными доминантными генетическими нарушениями, которые вызываются увеличением полиглутаминовой последовательности в белках атаксинах (*Atx*) [5]. Существует целый ряд свидетельств того, что нарушение нейрональной  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации может вносить свой вклад в патогенез этих заболеваний. Некоторые из этих данных приведены ниже.



**Рис. 1.** Модель  $\text{Ca}^{2+}$  дисрегуляции при БХ (цит. по [30]). В СШН при БХ  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  нарушает  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализацию посредством 3 синергичных механизмов.  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  усиливает функцию NR2B-содержащего NMDA-рецептора (наиболее вероятно, путем увеличения его транспорта в плазматическую мембрану).  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  прочно связывается с C-концом  $\text{InsP}_3\text{R1}$  и увеличивает его сродство к  $\text{InsP}_3$ . Низкие уровни глутамата, выделяемого из нейронов кортикостриатальной проекции, вызывают избыточный вход  $\text{Ca}^{2+}$  через рецептор NMDA и высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из ЭР через  $\text{InsP}_3\text{R1}$ . Добавочный вход  $\text{Ca}^{2+}$  в СШН опосредуется VGCC. Допамин, выделяемый допамиnergическими нейронами среднего мозга, стимулирует рецепторы допамина 1-го (D1R) и 2-го (D2R) типа, которые обильно экспрессируются в СШН. D1R связан с аденилат циклазой, они увеличивают уровень цАМФ и активируют протеин киназу А (PKA). PKA усиливает глутамат-индуцированные  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы посредством увеличения активности NMDA-рецептора и  $\text{InsP}_3\text{R1}$ . D2R напрямую связан с продукцией  $\text{InsP}_3$  и активацией  $\text{InsP}_3\text{R1}$ . Чрезмерный вход  $\text{Ca}^{2+}$  активирует кальпаин, который расщепляет  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  и другие субстраты. Избыток  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле приводит к захвату  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями через MCU, что, в свою очередь, запускает открытие мПТП и апоптоз. Кальциевая регуляция митохондрий продолжает нарушаться вследствие прямой связи  $\text{Хтт}^{\text{exp}}$  с митохондрией. Для симптоматического лечения БХ в США был одобрен антидопаминовый агент тетрабенезин (TBZ). Проходят клинические испытания антагонист NMDA-рецептора мемантин (ММТ), растворимый «митохондриальный агент» димебон (Dimebon) и «стабилизаторы митохондрий» креатин и коэнзим Q10 (CoQ10). Антиглутаматный агент рилузол (Riluzole) прошел клинические исследования, но оказался неподходящим для терапии БХ [19]



Таблица 2. Последние клинические испытания Ca<sup>2+</sup>-ингибиторов и стабилизаторов митохондрий при нейродегенеративных нарушениях

Нарушение	Препарат	Мишень	Стадия клинических испытаний	ID клинических испытаний	Информация предоставлена	Статус/ комментарии
БА	Димебон (Dimebon)	митохондрия (?)	Фаза III	NCT00675623	Medivation	Закончен, неудачный <a href="http://www.alzforum.org/new/detail.asp?id=2387">http://www.alzforum.org/new/detail.asp?id=2387</a>
	Кетасин (Ketasyn (AC-1202))	митохондрия	Фаза II	NCT00142805	NIA	Закончен
	MEM-1003	VGCC L-типа	Фаза II	NCT00257673	Memory Pharmaceuticals	Закончен
	ЕВТ-101	NR2B NMDA-рецептор	Фаза I	NCT00526968	Evotec Neurosciences	Закончен, фаза II планируется
HD	Димебон (Dimebon)	митохондрия (?)	Фаза II	NCT00497159	Medivation	Закончен, слабый эффект на когнитивную функцию
	Креатин (Creatine)	митохондрия	Фаза III	NCT00712426	MGH	Набор испытуемых
	Коэнзим Q10 (CoQ10)	митохондрия	Фаза III	NCT00608881	NINDS	Набор испытуемых
	Мемантин (Memantine)	NMDA-рецептор	Фаза IV	NCT00652457	UCSD	Набор испытуемых
	Рилузол (Riluzole)	антиглутаматный	Фаза III	NCT00277602	Sanofi-Aventis	Закончен, неудачный [19]

При СМА1 дегенерация клеток Пуркинье мозжечка вызывается увеличением CAG повторов в цитозольном/ядерном белке атаксине-1 [5]. Клетки Пуркинье мозжечка экспрессируют чрезвычайно высокие уровни белков Ca<sup>2+</sup>-сигнализации и Ca<sup>2+</sup>-связывающих белков. Снижение уровня Ca<sup>2+</sup>-связывающих белков в клетках Пуркинье отмечалось у пациентов на ранних стадиях развития СМА1 и у мышей – моделей этого заболевания [31]. Скрещивание трансгенных СМА1 мышей с мышами, у которых был нокаутирован кальбандин, приводило к усилению фенотипа заболевания [31]. На модели трансгенных СМА1 мышей на ранних этапах развития заболевания было показано снижение экспрессии некоторых белков Ca<sup>2+</sup>-сигнализации, таких как InsP<sub>3</sub>R1, Ca<sup>2+</sup>-канала TRPC3 и помпы ЭР SERCA2 [32]. Хотя и косвенно, эти данные подтверждают тот факт, что нарушения кальциевой сигнализации в клетках Пуркинье, вероятно, играют ключевую роль в развитии СМА1.

При СМА2 клетки Пуркинье мозжечка подвергаются дегенерации вследствие увеличения CAG повторов в цитозольном белке атаксине-2 [5]. Генетическая связь между полиморфизмом последовательности, кодирующей VGCC P/Q-типа и возрастом проявления первых симптомов у пациентов с СМА2 подтверждает, что Ca<sup>2+</sup>-сигнализация играет немаловажную роль в патогенезе этого заболевания [33]. В нашей лаборатории установлено, что мутантная форма атаксина-2 специфично связывает и активирует InsP<sub>3</sub>R1, подобно тому как это имеет место с мутантной формой белка Хантингтина (в печати). Нами также показано, что ингибиторы Ca<sup>2+</sup>-сигнализации при СМА2 защищают клетки Пуркинье от клеточной смерти в условиях *in vitro* и оказывают достоверный положительный эффект в исследованиях с использованием трансгенных СМА2 мышей (в печати).

При СМА3 нейроны черного вещества и ядер моста подвергаются дегенерации в результате увеличения CAG повторов в цитозольном белке атаксине-3 [5]. Кальпаин-опосредованное расщепление атаксина-3 играет важную

роль в патогенезе СМА3 [34]. Недавно нами было показано, что мутантная форма атаксина-3 специфично связывается и активирует InsP<sub>3</sub>R1, подобно тому как это имеет место с мутантной формой белка Хантингтина [35]. В дальнейшем было установлено, что длительное скормливание трансгенным мышам с СМА3 ингибитора RyanR и Ca<sup>2+</sup>-стабилизатора дантролена облегчает возраст-зависимый дефицит моторной координации у этих мышей и предотвращает потерю нейронов в черном веществе и ядрах моста [35].

При СМА6 клетки Пуркинье мозжечка подвергаются дегенерации вследствие увеличения CAG повторов в С-конце Ca<sub>v</sub>2.1 пороформирующей субъединицы Ca<sup>2+</sup>-канала P/Q-типа [5]. Сообщалось, что эта мутация увеличивает активность Ca<sup>2+</sup>-канала P/Q-типа в экспрессионной системе [36]. Однако последние исследования, проведенные на мышах со СМА6, показали, что эта патология может быть связана и с агрегацией Ca<sub>v</sub>2.1 субъединиц и со снижением плотности Ca<sup>2+</sup>-токов через каналы P/Q-типа в дендритах [37]. Таким образом, вопрос о точной роли нарушения Ca<sup>2+</sup>-сигнализации при СМА6 остается открытым.

Аномальная нейрональная Ca<sup>2+</sup>-сигнализация не ограничивается только атаксиями с увеличением полиглутаминовых повторов, но также может играть немаловажную роль и в атаксиях другого типа. Так, последние генетические исследования показали, что причиной СМА15 является потеря фрагмента гена, кодирующего InsP<sub>3</sub>R1 [38].

### НЕЙРОНАЛЬНАЯ Ca<sup>2+</sup>-СИГНАЛИЗАЦИЯ И БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Болезнь Альцгеймера (БА) – это нейродегенеративное нарушение, приводящее к потере памяти. В большинстве случаев БА является спорадической и характеризуется поздним проявлением симптомов (старше 60 лет). Небольшая часть от всех случаев этого заболевания (наследственная БА, НБА) характеризуется ранним проявлением симптомов и генетическим наследованием.

## НЕЙРОНАЛЬНАЯ $Ca^{2+}$ -СИГНАЛИЗАЦИЯ И СПОРАДИЧЕСКАЯ БА

Спорадическая БА является «многоцелевым» нарушением, которое вызывается совместным действием нескольких патологических факторов. Одним из таких факторов является старение. Другие факторы определяются популяциями нейронов, которые поражаются при этом заболевании – в данном случае это кортикальные и гиппокампальные нейроны. Основным «болезнь-специфичным» фактором при БА, вероятно, является накопление амилоидных агрегатов. Из-за того, что данное заболевание является «многоцелевым», успех в его лечении может быть достигнут только с применением комплексной терапии.

Популяции нейронов, в которых экспрессируются высокие уровни  $Ca^{2+}$ -связывающих белков, остаются относительно незатронутыми БА, в то время как популяции нейронов с низким уровнем экспрессии этих белков поражаются при этом заболевании в значительной степени. Снижение уровня  $Ca^{2+}$ -связывающих белков в нейронах – одно из обычных последствий естественного процесса старения. Вероятно, одна из причин, приводящих к повышенной уязвимости нейронов стареющего организма к БА, – это снижение буферной емкости цитозоля нейронов к ионам  $Ca^{2+}$ .

В нейронах престарелых больных, страдающих спорадической формой БА, наблюдается активация  $Ca^{2+}$ -зависимых протеаз семейства кальпаина. Активация кальпаинов происходит в ответ на повышение уровня  $Ca^{2+}$  в цитозоле. Активированные кальпаины расщепляют разнообразные белки, необходимые для нормального функционирования нейрона, что приводит к нейрональной дисфункции и клеточной гибели.

В нейронах пациентов с БА также серьезно поражаются митохондрии. Эти органеллы частично деполяризуются, в них снижается способность связывать  $Ca^{2+}$ , нарушается стехиометрия компонентов цепи передачи электронов, мутирует митохондриальная ДНК. Сходные, но менее выраженные изменения происходят и в митохондриях нейронов при естественном процессе старения. Повреждение митохондрий, вероятно, вызывается переполнением этой органеллы  $Ca^{2+}$ , что приводит к образованию больших количеств активных форм кислорода и к оксидативному повреждению митохондриальной ДНК. Таким образом, митохондрии, судя по всему, находятся на самых последних ступенях  $Ca^{2+}$ -сигнализации в патогенном каскаде. Тем не менее ожидается, что «стабилизаторы митохондрий» (такие как коэнзим Q10 и креатин) должны оказывать некоторое благоприятное действие при этих нарушениях. Препараты, направленные на митохондриальную проницаемую транзитную пору (мПТП), должны быть также чрезвычайно ценными как «последняя линия защиты» нейрона, откладывающая во времени развитие нейрональной дисфункции и клеточной смерти.

Процесс старения оказывает воздействие на нейрональную  $Ca^{2+}$ -сигнализацию и, по всей видимости, является одним из факторов, вовлекаемых в патогенез спорадической формы БА. Так, ожидается, что блокаторы  $Ca^{2+}$ -сигнализации могут оказывать благотворное действие при данном заболевании. Антагонист NMDA-рецептора мемантин показал некоторую клиническую эффектив-

ность при БА. Для лечения этого заболевания требуются разработка и клинические испытания новых дополнительных блокаторов  $Ca^{2+}$ -сигнализации как самих по себе, так и как части комплексной терапии наряду со «стабилизаторами митохондрий» и ингибиторами мПТП.

## НЕЙРОНАЛЬНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ И НАСЛЕДСТВЕННАЯ БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА. КАЛЬЦИЕВАЯ ГИПОТЕЗА ПАТОГЕНЕЗА БА

Основной идеей в объяснении развития БА является «амилоидная гипотеза», которая постулирует, что основной причиной гибели нейронов и снижения числа синапсов при этой болезни является увеличение продукции амилоидного пептида A $\beta$ 42 (или увеличение соотношения A $\beta$ 42/40) [39]. Экспериментальное обоснование «амилоидной гипотезы» исходит из того, что: (1) аккумуляция амилоидных бляшек наблюдается в головном мозге пациентов с БА; (2) наследственная форма БА (НБА) обусловлена точечными мутациями в белке-предшественнике  $\beta$ -амилоида A $\beta$  (APP); (3) НБА также обусловлена точечными мутациями в пресенилинах, которые формируют каталитическую субъединицу  $\gamma$ -секретазы, фермента, расщепляющего APP. В настоящее время «амилоид-направленная» терапия является центральной в разработке лекарственных препаратов для лечения БА. Последние клинические испытания показали, что необходимо искать новые цели для лекарственного воздействия при терапии БА помимо амилоида [40]. Большое количество данных указывает на то, что важную роль в развитии БА играет нарушение гомеостаза  $Ca^{2+}$  в нейронах. В последнее время активно обсуждались аргументы в пользу «кальциевой гипотезы» развития БА [41]. Эта гипотеза будет рассмотрена ниже.

Одна из ключевых взаимосвязей между патогенезом БА и  $Ca^{2+}$  проистекает из данных о том, что олигомеры A $\beta$  могут формировать  $Ca^{2+}$ -проницаемые каналы в мембранах [42]. Способность олигомеров A $\beta$  ассоциироваться с мембранами усиливается при появлении на поверхности мембраны фосфатидилсерина (PtdS) [43], что обычно является показателем клетки, находящейся в условиях дефицита энергии. Возрастные изменения в митохондриях могут увеличивать уровень поверхностных PtdS в нейронах и таким образом провоцировать в них A $\beta$ -опосредованное формирование пор, вход  $Ca^{2+}$  и клеточную смерть (рис. 2). Действительно, нейроны со сниженным уровнем АТФ в цитозоле и увеличенным уровнем PtdS особенно уязвимы для A $\beta$ -опосредованной токсичности [44]. Способность олигомеров A $\beta$  формировать  $Ca^{2+}$ -проницаемые каналы в плазматической мембране нейронов согласуется с результатами последних экспериментов по определению внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  в условиях *in vivo*, проведенных на трансгенных APP мышах [45]. Авторами этого исследования было установлено, что уровни  $Ca^{2+}$  примерно в 35 % нейритов, расположенных в непосредственной близости к амилоидным бляшкам, были достоверно выше, чем в контрольных клетках. Наиболее вероятное объяснение этого факта состоит в том, что высокая локальная концентрация олигомеров A $\beta$  в области, прилегающей к амилоидной бляшке, вызывает формирование  $Ca^{2+}$ -проницаемых ионных каналов в плазматической мембране нейронов. Аксоны с увеличенным уровнем  $Ca^{2+}$  утрачивают шипики и демон-

стрируют нарушение морфологии [45]. Морфологическое изменение в этих аксонах может быть уменьшено при действии ингибитора кальцинейрина FK-506 [45]. На основании этого можно предположить, что кальцинейрин играет важную роль в патологическом ответе нейронов на повышение уровня  $Ca^{2+}$ . Наряду с прямыми эффектами на проницаемость плазматической мембраны для  $Ca^{2+}$  олигомеры Aβ также оказывают воздействие на нейрональный  $Ca^{2+}$  гомеостаз посредством модулирования активности NMDA-рецептора [46, 47] (рис. 2), AMPA-рецептора [48] и P/Q-типов VGCC [49].

Другая важная взаимосвязь между  $Ca^{2+}$ -сигнализацией и БА была выявлена из того факта, что многие мутации пресенилинов при НБА приводят к нарушениям  $Ca^{2+}$ -сигнализации. Первоначально связь между пресенилинами и  $Ca^{2+}$ -сигнализацией была установлена, когда появилось сообщение о том, что фибробласты пациентов с НБА выделяют сверхнормальные количества  $Ca^{2+}$  в ответ на действие  $InsP_3$  [50]. Сходные данные были получены в экспериментах на клетках, экспрессирующих мутантные пресенилины, характерные для БА [51], и на кортикальных нейронах мышей, экспрессирующих мутантную форму пресенилинов, характерную для НБА [52, 53]. Для объяснения этих результатов было выдвинуто предположение о том, что мутантные формы пресенилинов воздействуют на депо-управляемый вход  $Ca^{2+}$  [54, 55], увеличивают активность и/или экспрессию внутриклеточных  $Ca^{2+}$  ионных каналов, таких как RyanR [53, 56, 57] и  $InsP_3R$  [58, 59], или модулируют функцию  $Ca^{2+}$ -помпы SERCA в ЭР [60]. В нашей лаборатории установлено, что пресенилины сами по себе работают как каналы утечки  $Ca^{2+}$  из ЭР и что многие мутации пресенилинов при НБА ведут к утрате этой функции канала утечки  $Ca^{2+}$ , что вызывает переполнение ЭР  $Ca^{2+}$  и чрезмерное высвобождение  $Ca^{2+}$  из ЭР [61, 62]. Несмотря на отличия в деталях предложенных механизмов, большинство представленных исследований согласуются в том, что многие мутации пресенилинов при НБА приводят к избыточному высвобождению  $Ca^{2+}$  из ЭР через  $InsP_3R$  и RyanR.

Существует несколько особенно токсичных эффектов входа  $Ca^{2+}$  через Aβ каналы и чрезмерного высвобождения  $Ca^{2+}$  из ЭР. Как указывалось выше, повышенный уровень цитозольного  $Ca^{2+}$  может вызывать активацию кальцинейрина и атрофию [45] (рис. 2). Чрезмерно высокий уровень  $Ca^{2+}$  также активирует кальпаины, которые разрушают сигнальные ферменты, вовлекаемые в процессы обучения и памяти [25, 63] (рис. 2). Старые нейроны становятся чувствительными к токсичности цитозольного  $Ca^{2+}$ , поскольку с возрастом буферная способность цитозоля снижается. Действительно, обнаружена четкая корреляция между снижением экспрессии  $Ca^{2+}$ -связывающих белков в районе зубчатой извилины гиппокампа и проявлением когнитивных нарушений при БА [64]. Сверхнормальные цитозольные  $Ca^{2+}$ -сигналы могут вызывать чрезмерный вход  $Ca^{2+}$  в митохондрии и приводить к апоптозу клетки (рис. 2). Известные благоприятные воздействия нестероидных противовоспалительных препаратов могут быть связаны со способностью этих лекарств уменьшать митохондриальный захват  $Ca^{2+}$  [65].

В заключение необходимо отметить, что большое количество экспериментальных данных указывает на избыточ-

ное содержание  $Ca^{2+}$  в цитозоле нейронов вследствие накопления олигомеров Aβ или экспрессии мутантных форм пресенилинов, характерных для НБА. Дальнейшее подтверждение связи между  $Ca^{2+}$ -сигнализацией и БА было получено из недавнего сообщения о том, что мутация в новом канале входа  $Ca^{2+}$  CALHM1 может увеличивать риск

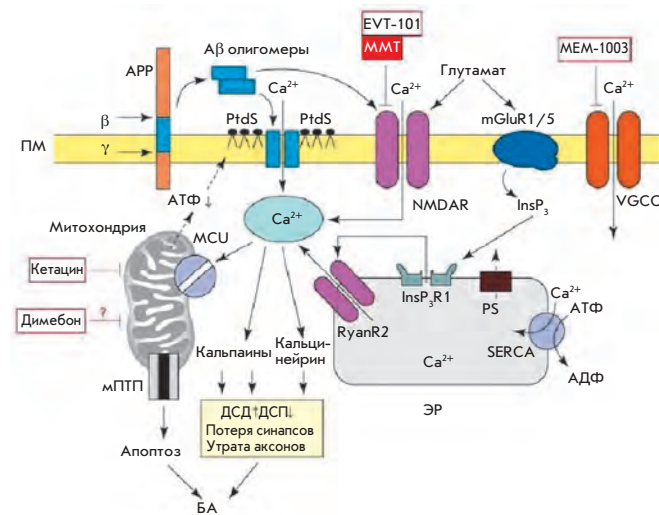


Рис. 2. Модель  $Ca^{2+}$ -дисрегуляции при БА (цит. по [41]). Последовательное расщепление белка-предшественника β-амилоида (APP) β-секретазой (β) и γ-секретазой (γ) приводит к образованию Aβ. Aβ формирует олигомеры, которые могут встраиваться в плазматическую мембрану (ПМ) и формировать  $Ca^{2+}$ -проницаемые поры. Ассоциация олигомеров Aβ с плазматической мембраной усиливается посредством связывания с поверхностным фосфатидилсерином (PtdS); процесс старения и  $Ca^{2+}$ -опосредованное повреждение митохондрий приводят к уменьшению содержания АТФ и могут запускать перемещение PtdS со внутренней поверхности плазматической мембраны на ее внешнюю поверхность. Снижение уровня АТФ и потеря целостности мембраны ведут к деполяризации мембраны, что, в свою очередь, вызывает усиление входа  $Ca^{2+}$  через NMDA рецепторы и VGCC. Олигомеры Aβ также могут напрямую воздействовать на аффинность NMDA-рецептора, AMPA-рецептора и VGCC. Глутамат вызывает активацию рецепторов mGluR1/5, продукцию  $InsP_3$  и  $InsP_3$ -опосредованное высвобождение  $Ca^{2+}$  из ЭР. Пресенилины (PS) функционируют как каналы утечки  $Ca^{2+}$  из ЭР, и многие мутации при НБА нарушают функцию пресенилинов как каналов утечки  $Ca^{2+}$ . Последнее приводит к чрезмерному накоплению  $Ca^{2+}$  в ЭР. Увеличение уровня  $Ca^{2+}$  в ЭР приводит к усилению его выброса через рецептор  $InsP_3$  первого типа ( $InsP_3R1$ ) и риадиноновый рецептор второго типа (RyanR2). PS также могут напрямую модулировать активность  $InsP_3R$ , RyanR и помпы SERCA. Увеличение концентрации цитозольного  $Ca^{2+}$  ведет к активации кальцинейрина и кальпаинов, что усиливает долгосрочную депрессию (ДСД), подавляет долгосрочную потенциацию (ДСП), приводит к модификации нейронального цитоскелета, потере синапсов и атрофии аксонов. Чрезмерно высокий уровень  $Ca^{2+}$  в митохондриях, возникший вследствие работы митохондриального  $Ca^{2+}$ -переносчика (MCU), в конечном итоге приводит к открытию митохондриальной проницаемой транзитной поры (мПТП) и апоптозу. Для лечения БА был одобрен ингибитор NMDA-рецептора мемантин (ММТ), и недавно разработан NR2B-специфичный антагонист EVT-101. Сейчас проходят клинические испытания следующие препараты для терапии БА: «оптимизированный для ЦНС» ингибитор VGCC L-типа MEM-1003, возможный «митохондриальный агент» Димебон (Dimebon) и «митохондриальный витамин» Кетацин (Ketaspyn).



позднего развития БА [66] (но см. также [67]). Предложенная модель (рис. 2) предлагает целый ряд потенциальных мишеней для терапии БА. Образованные  $A\beta$   $Ca^{2+}$ -каналы сами по себе являются чрезвычайно привлекательной мишенью для воздействия [68]. Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США для лечения БА уже одобрен мемантин – неконкурентный ингибитор NMDA-рецептора (табл. 1). Могут быть разработаны потенциально более специфичные ингибиторы NMDA-рецептора, такие как нитромемантины [69]. В последнее время компанией Evotec Inc для терапии БА разработан NR2B-специфичный антагонист EVT101 (табл. 2). Ингибитор VGCC L-типа MEM-1003 (Memory Pharmaceuticals) прошел вторую фазу клинических испытаний (табл. 2). Другие потенциальные и в основном неисследованные мишени для терапии БА включают в себя: внутриклеточные  $Ca^{2+}$ -каналы (RyanR и InsP<sub>3</sub>R), помпу SERCA, кальцинейрин и митохондриальную систему регулирования  $Ca^{2+}$ .

Представленные данные позволяют по-новому взглянуть на терапию нейродегенеративных патологий. Предложенная нами  $Ca^{2+}$ -гипотеза закладывает основу для разработки новых классов препаратов.

### **Ca<sup>2+</sup>-СИГНАЛИЗАЦИЯ: ТЕКУЩИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРИЛОЖЕНИЯ**

**Митохондриальные стабилизаторы и антидепрессанты.** Кетасин (Ketasyn), креатин, коэнзим Q10 (CoQ10) и MitoQ прошли клинические испытания на БА и БХ. Поскольку митохондрии играют ключевую роль в патогенезе указанных заболеваний [70], от этих клинических испытаний ожидалось некоторые благотворные эффекты. Однако митохондрии задействуются в патологическом процессе на довольно поздних стадиях, и эффекты этих препаратов, вероятно, будут ограниченными. Действительно, согласно имеющимся сообщениям в данном классе соединений обнаружены весьма скромные эффекты при терапии нейродегенеративных нарушений [70].

**Димебон (Dimebon).** Димебон (Medivation Inc) показал обещающие результаты (основанные на результатах когнитивных исследований больных) на второй фазе клинических испытаний терапии БА [71]. Димебон также прошел вторую фазу клинических испытаний терапии БХ, в результате которой наблюдался слабый эффект на мозговую деятельность пациентов (Kiebertz K., McDermott M.P., Voss T.S., Corey-Bloom J., Deuel L.M., Dorsey E.R., Factor S., Geschwind M.D., Hodgeman K., Kayson E., Noonberg S., Pourfar M., Rabinowitz K., Ravina B.,

Sanchez-Ramos J., Seely L., Walker F., Feigin A.; and the Dimebon in Subjects with Huntington Disease (DIMOND) Investigators of the Huntington Study Group. A randomized, placebo-controlled trial of latrepirdine in Huntington Disease. Arch Neurol. 2010 Feb;67(2):154-60). Димебон – давно известный в России антигистаминный препарат, который, как сообщалось, обладает нейропротективным действием в пикомолярных концентрациях посредством нового механизма действия на митохондрии [72]. Однако в наших исследованиях на культуре срединных шипиковых нейронов стриатума мы наблюдали достоверный нейропротективный эффект Димебона в концентрации 50 мкМ [73]. Мы заключили, что когнитивное действие Димебона, отмеченное в клинических испытаниях при терапии БА [71], вероятно обусловлено способностью этого соединения ингибировать  $\alpha$ -адренергические, гистаминовые и серотониновые высокоаффинные рецепторы [73]. В марте 2010 г. третья фаза клинических испытаний Димебона для терапии БА закончилась полной неудачей (<http://www.alzforum.org/new/detail.asp?id=2387>). В настоящий момент неясно, будет ли продолжена разработка Димебона для лечения БА и БХ.

**Антагонисты NMDA-рецептора.** Мемантин (Memantine) – неконкурентный антагонист NMDA-рецептора, который одобрен FDA для терапии БА. Мемантин также проходит клинические испытания при БХ. Для лечения БА был разработан NR2B-специфичный антагонист EVT101 и EVT103 (Evotec Inc), и вскоре ожидается вторая фаза клинических испытаний этих препаратов. Эти же соединения представляют большой интерес с точки зрения терапии БХ.

**Рилузол (Riluzole).** Антиглутаматный агент рилузол одобрен FDA для лечения АЛС. Рилузол также прошел третью фазу клинических испытаний при БХ, но не показал сколько-нибудь достоверных улучшений при измерении моторики пациентов [19].

**Антагонисты VGCC L-типа.** «Оптимизированный для ЦНС» ингибитор VGCC L-типа MEM-1003 (Memory Pharmaceuticals) показал некоторый положительный эффект на второй фазе клинических испытаний при БА.

В заключение необходимо признать, что развитие новых направлений в исследовании мозга с помощью современных молекулярно-биологических и электрофизиологических подходов неизбежно приведет к раскрытию тайн высокоэффективной передачи информации и вместе с тем поможет продвинуться по пути излечения нейродегенерации. ●

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- Berridge M.J. Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21:13-26. 1998.
- Toescu E.C., Verkhratsky A. The importance of being subtle: small changes in calcium homeostasis control cognitive decline in normal aging. *Aging Cell*. 2007. 6:267-273
- Gant J.C., Sama M.M., Landfield P.W., Thibault O. Early and simultaneous emergence of multiple hippocampal biomarkers of aging is mediated by  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release. *J. Neurosci*. 2006. 26:3482-3490.
- Foster T.C. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell*. 2007. 6:319-325.
- Gusella J.F., MacDonald M.E. Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci*. 2000. 1:109-115.
- Li S., Li X.J. Multiple pathways contribute to the pathogenesis of Huntington disease. *Mol. Neurodegener*. 2006. 1:19.
- Kuhn A. et al. Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum. Mol. Genet*. 2007. 16:1845-1861.
- Bezprozvanny I., Hayden M.R. Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004. 322:1310-1317.
- Tang T.-S., Tu H., Chan E.Y., Maximov A., Wang Z., Wellington C.L., Hayden M.R., Bezprozvanny I. Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron*. 2003. 39:227-239.
- Kaltenbach L.S. et al. Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS. Genet*. 2007. 3:e82.
- Tang T.-S., Slow E.J., Lupu V., Stavrovskaya I.G., Sugimori M., Llinas R., Kristal B.S., Hayden M.R., Bezprozvanny I. Disturbed  $Ca^{2+}$  signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2005. 102:2602-2607.
- Zhang H., Li Q., Graham R.K., Slow E., Hayden M.R., Bezprozvanny I. Full length mutant huntingtin is required for altered  $Ca^{2+}$  signaling and apoptosis of striatal neurons in the YAC mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis*. 2008. 31:80-88.
- Tang T.S., Guo C., Wang H., Chen X., Bezprozvanny I. Neuroprotective effects of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor C-terminal fragment in a Huntington's disease mouse model. *J. Neurosci*. 2009. 29:1257-1266.



14. Zeron M.M., Hansson O., Chen N., Wellington C.L., Leavitt B.R., Brundin P., Hayden M.R., Raymond L.A. Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron*. 2002. 33:849–860.
15. Fan M.M., Fernandes H.B., Zhang L.Y., Hayden M.R., Raymond L.A. Altered NMDA receptor trafficking in a yeast artificial chromosome transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci*. 2007. 27:3768–3779.
16. Shehadeh J., Fernandes H.B., Zeron Mullins M.M., Graham R.K., Leavitt B.R., Hayden M.R., Raymond L.A. Striatal neuronal apoptosis is preferentially enhanced by NMDA receptor activation in YAC transgenic mouse model of Huntington disease. *Neurobiol. Dis.* 2006. 21:392–403.
17. Wu J., Tang T.-S., Bezprozvanny I. Evaluation of clinically-relevant glutamate pathway inhibitors in vitro model of Huntington's disease. *Neurosci. Lett.* 2006. 407:219–223.
18. Ondo W.G., Mejia N.I., Hunter C.B. A pilot study of the clinical efficacy and safety of memantine for Huntington's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2007. 13:453–454.
19. Landwehrmeyer G.B., Dubois B., de Yébenes J.G., Kremer B., Gaus W., Kraus P.H., Przuntek H., Dib M., Doble A., Fischer W., Ludolph A.C. Riluzole in Huntington's disease: a 3-year, randomized controlled study. *Ann. Neurol.* 2007. 62:262–272.
20. Swayne L.A., Chen L., Hameed S., Barr W., Charlesworth E., Colicos M.A., Zamponi G.W., Braun J.E. Crosstalk between huntingtin and syntaxin 1A regulates N-type calcium channels. *Mol. Cell. Neurosci.* 2005. 30:339–351.
21. Romero E., Cha G.H., Verstreken P., Ly C.V., Hughes R.E., Bellen H.J., Botas J. Suppression of neurodegeneration and increased neurotransmission caused by expanded full-length huntingtin accumulating in the cytoplasm. *Neuron*. 2008. 57:27–40.
22. Cepeda C., Wu N., Andre V.M., Cummings D.M., Levine M.S. The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* 2007. 81:253–271.
23. Gafni J., Hermel E., Young J.E., Wellington C.L., Hayden M.R., Ellerby L.M. Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J. Biol. Chem.* 2004. 279:20211–20220.
24. Cowan C.M., Fan M.M., Fan J., Shehadeh J., Zhang L.Y., Graham R.K., Hayden M.R., Raymond L.A. Polyglutamine-modulated striatal calpain activity in YAC transgenic huntingtin disease mouse model: impact on NMDA receptor function and toxicity. *J. Neurosci.* 2008. 28:12725–12735.
25. Vosler P.S., Brennan C.S., Chen J. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 2008. 38:78–100.
26. Bossy-Wetzell E., Petrilli A., Knott A.B. Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* 2008. 31:609–616.
27. Panov A.V., Gutekunst C.A., Leavitt B.R., Hayden M.R., Burke J.R., Strittmatter W.J., Greenamyre J.T. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.* 2002. 5:731–736.
28. Wang X., Zhu S., Pei Z., Drozda M., Stavrovskaya I.G., Del Signore S.J., Cormier K., Shimony E.M., Wang H., Ferrante R.J., Kristal B.S., Friedlander R.M. Inhibitors of cytochrome c release with therapeutic potential for Huntington's disease. *J. Neurosci.* 2008. 28:9473–9485.
29. Savani A.A., Loggin I.S. Tetraabenazine as antichorea therapy in Huntington disease: a randomized controlled trial. *Neurology*. 2007. 68:797; author reply 797.
30. Tang T.S., Chen X., Liu J., Bezprozvanny I. Dopaminergic signaling and striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci.* 2007. 27:7899–7910.
31. Vig P.J., Subramony S.H., McDaniel D.O. Calcium homeostasis and spinocerebellar ataxia-1 (SCA-1). *Brain Res. Bull.* 2001. 56:221–225.
32. Lin X., Antalffy B., Kang D., Orr H.T., Zoghbi H.Y. Polyglutamine expansion downregulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. *Nat. Neurosci.* 2000. 3:157–163.
33. Pulst S.M., Santos N., Wang D., Yang H., Huynh D., Velazquez L., Figueroa K.P. Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset. *Brain*. 2005. 128:2297–2303.
34. Haacke A., Hartl F.U., Breuer P. Calpain inhibition is sufficient to suppress aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3. *J. Biol. Chem.* 2007. 282:18851–18856.
35. Chen X., Tang T.-S., Tu H., Nelson O., Pook M.A., Hammer R.E., Nukina N., Bezprozvanny I. Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *J. Neurosci.* 2008. 28:12713–12724.
36. Piedras-Renteria E.S., Watase K., Harata N., Zhuchenko O., Zoghbi H.Y., Lee C.C., Tsien R.W. Increased expression of alpha 1A Ca<sup>2+</sup> channel currents arising from expanded trinucleotide repeats in spinocerebellar ataxia type 6. *J. Neurosci.* 2001. 21:9185–9193.
37. Watase K., Barrett C.F., Miyazaki T., Ishiguro T., Ishikawa K., Hu Y., Unno T., Sun Y., Kasai S., Watanabe M., Gomez C.M., Mizusawa H., Tsien R.W., Zoghbi H.Y. Spinocerebellar ataxia type 6 knockin mice develop a progressive neuronal dysfunction with age-dependent accumulation of mutant Ca<sub>v</sub>2.1 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2008. 105:11987–11992.
38. van de Leemput J. et al. Deletion of ITPRI1 underlies ataxia in mice and spinocerebellar ataxia 15 in humans. *PLoS Genet.* 2007. 3:e108.
39. Hardy J., Selkoe D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002. 297:353–356.
40. Seabrook G.R., Ray W.J., Shearman M., Hutton M. Beyond amyloid: the next generation of Alzheimer's disease therapeutics. *Mol. Interv.* 2007. 7:261–270.
41. Bezprozvanny I., Mattson M.P. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 2008. 31:454–463.
42. Arispe N., Rojas E., Pollard H.B. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1993. 90:567–571.
43. Lee G., Pollard H.B., Arispe N. Annexin 5 and apolipoprotein E2 protect against Alzheimer's amyloid-beta-peptide cytotoxicity by competitive inhibition at a common phosphatidylserine interaction site. *Peptides*. 2002. 23:1249–1263.
44. Simakova O., Arispe N.J. The cell-selective neurotoxicity of the Alzheimer's Abeta peptide is determined by surface phosphatidylserine and cytosolic ATP levels. Membrane binding is required for Abeta toxicity. *J. Neurosci.* 2007. 27:13719–13729.
45. Kuchibhotla K.V., Goldman S.T., Lattarulo C.R., Wu H.Y., Hyman B.T., Bacskai B.J. Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron*. 2008. 59:214–225.
46. De Felice F.G., Velasco P.T., Lambert M.P., Viola K., Fernandez S.J., Ferreira S.T., Klein W.L. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J. Biol. Chem.* 2007. 282:11590–11601.
47. Shankar G.M., Bloodgood B.L., Townsend M., Walsh D.M., Selkoe D.J., Sabatini B.L. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* 2007. 27:2866–2875.
48. Hsieh H., Boehm J., Sato C., Iwatsubo T., Tomita T., Sisodia S., Malinow R. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*. 2006. 52:831–843.
49. Nimrich V., Grimm C., Draguhn A., Barghorn S., Lehmann A., Schoemaker H., Hillen H., Gross G., Ebert U., Bruehl C. Amyloid beta oligomers (A beta(1–42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents. *J. Neurosci.* 2008. 28:788–797.
50. Ito E., Oka K., Etcheberrigaray R., Nelson T.J., McPhie D.L., Tofel-Grehl B., Gibson G.E., Alkon D.L. Internal Ca<sup>2+</sup> mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1994. 91:534–538.
51. Leissring M.A., Paul B.A., Parker I., Cotman C.W., LaFerla F.M. Alzheimer's presenilin-1 mutation potentiates inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signaling in Xenopus oocytes. *J. Neurochem.* 1999. 72:1061–1068.
52. Stutzmann G.E., Caccamo A., LaFerla F.M., Parker I. Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated Ca<sup>2+</sup> signals and altered membrane excitability. *J. Neurosci.* 2004. 24:508–513.
53. Stutzmann G.E., Smith I., Caccamo A., Oddo S., Laferla F.M., Parker I. Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to Ca<sup>2+</sup> disruptions in young, adult, and aged Alzheimer's disease mice. *J. Neurosci.* 2006. 26:5180–5189.
54. Leissring M.A., Akbari Y., Fanger C.M., Cahalan M.D., Mattson M.P., LaFerla F.M. Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J. Cell. Biol.* 2000. 149:793–798.
55. Yoo A.S., Cheng I., Chung S., Grenfell T.Z., Lee H., Pack-Chung E., Handler M., Shen J., Xia W., Tesco G., Saunders A.J., Ding K., Froesch M.P., Tanzi R.E., Kim T.W. Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry. *Neuron*. 2000. 27:561–572.
56. Chan S.L., Mayne M., Holden C.P., Geiger J.D., Mattson M.P. Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 2000. 275:18195–18200.
57. Rybalchenko V., Hwang S.Y., Rybalchenko N., Koulen P. The cytosolic N-terminus of presenilin-1 potentiates mouse ryanodine receptor single channel activity. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2008. 40:84–97.
58. Cai C., Lin P., Cheung K.H., Li N., Levchook C., Pan Z., Ferrante C., Boulianne G.L., Foskett J.K., Danielpour D., Ma J. The presenilin-2 loop peptide perturbs intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis and accelerates apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2006. 281:16649–16655.
59. Cheung K.H., Shineman D., Muller M., Cardenas C., Mei L., Yang J., Tomita T., Iwatsubo T., Lee V.M., Foskett J.K. Mechanism of Ca<sup>2+</sup> disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP(3) receptor channel gating. *Neuron*. 2008. 58:871–883.
60. Green K.N., Demuro A., Akbari Y., Hitt B.D., Smith I.F., Parker I., LaFerla F.M. SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid beta production. *J. Cell. Biol.* 2008. 181:1107–1116.
61. Tu H., Nelson O., Bezprozvanny A., Wang Z., Lee S.-F., Hao Y.H., Searns L., De Strooper B., Yu G., Bezprozvanny I. Presenilins form ER peptide leak channels, a function disrupted by mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Cell*. 2006. 126:981–993.
62. Nelson O., Tu H., Lei T., Bentahir M., de Strooper B., Bezprozvanny I. Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca<sup>2+</sup> leak function of presenilin 1. *J. Clin. Invest.* 2007. 117:1230–1239.
63. Trinchese F., Fa M., Liu S., Zhang H., Hidalgo A., Schmidt S.D., Yamaguchi H., Yoshii N., Mathews P.M., Nixon R.A., Arancio O. Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 2008. 118:2796–2807.
64. Palop J.J., Jones B., Kekoni L., Chin J., Yu G.-Q., Raber J., Masliah E., Mucke L. Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2003. 100:9572–9577.
65. Sanz-Blasco S., Valero R.A., Rodriguez-Crespo I., Villalobos C., Nunez L. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload underlies Abeta oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs. *PLoS ONE*. 2008. 3:e2718.
66. Dreses-Werringloer U. et al. A polymorphism in CALHM1 influences Ca<sup>2+</sup> homeostasis, A beta levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell*. 2008. 133:1149–1161.
67. Bertram L., Schjeide B.M., Hooli B., Mullin K., Hiltunen M., Soininen H., Ingelsson M., Lannfelt L., Blacker D., Tanzi R.E. No association between CALHM1 and Alzheimer's disease risk. *Cell*. 2008. 135:993–994; author reply 994–996.
68. Arispe N., Diaz J.C., Simakova O. Abeta ion channels. Prospects for treating Alzheimer's disease with Abeta channel blockers. *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. 1768:1952–1965.
69. Lipton S.A. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2006. 5:160–170.
70. Chaturvedi R.K., Beal M.F. Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008. 1147:395–412.
71. Doody R.S., Gavrilova S.I., Sano M., Thomas R.G., Aisen P.S., Bachurin S.O., Seely L., Hung D. Effect of dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet*. 2008. 372:207–215.
72. Bernales S., Wagner S., Protter A.A., Hung D.T. Dimebon induces neurite outgrowth and mitochondrial stabilization. *Society for Neuroscience Abstracts*. 2008. 543.29.
73. Wu J., Li Q., Bezprozvanny I. Evaluation of Dimebon in cellular model of Huntington's disease. *Mol. Neurodegener.* 2008. 3:15.

УДК 579.8.06

# Новый метод высокоразрешающего геномного ПЦР-фингерпринтинга энтеробактерий

А.С. Исаева, Е.Е. Куликов, К.К. Тарасян, А.В. Летаров\*

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 2

\*E-mail: letarov@gmail.com

**РЕФЕРАТ** Нами разработана оригинальная система геномного ПЦР-фингерпринтинга для дифференциации штаммов энтеробактерий, использующая единственный олигонуклеотид, специфичный к инвертированным терминальным повторам инсерционного элемента IS1 (IS1-профилинг). Эта система обладает большей разрешающей способностью, чем широко применяемый метод BOX-ПЦР; она позволяет дифференцировать близкородственные штаммы, идентичные по профилям BOX-ПЦР и риботипам, но различающиеся по чувствительности к фагам. По сравнению с аналогами наша система значительно менее чувствительна к качеству используемого оборудования и материалов. В то же время система BOX-ПЦР является более универсальной и пригодна для группировки штаммов и установления их ближних филогенетических отношений. Таким образом, предложенная нами система IS1-фингерпринтинга энтеробактерий является существенным дополнением к существующему инструментарию молекулярной дифференциации энтеробактерий, позволяющим решать задачи, связанные с детализированным исследованием высокогетерогенных и быстро эволюционирующих естественных популяций этих бактерий, в т.ч. в ходе работ по экологии колифагов.

Однако некоторые штаммы не могут быть надежно дифференцированы с помощью IS1-профилинга из-за малого количества полос в паттернах, генерируемых на матрицах их ДНК. Для улучшения технических характеристик системы нами предложена модификация системы с использованием дополнительного праймера TR8834, специфичного к нуклеотидной последовательности гена транспозазы, распространенного в геномах колиформных бактерий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** геномный фингерпринтинг, ПЦР-фингерпринтинг на целых клетках, инсерционный элемент, разнообразие энтеробактерий, дифференциация штаммов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** IS – инсерционная последовательность (insertion sequence), ERIC – энтеробактериальная повторяющаяся интрагенная последовательность (enterobacterial repetitive intergenic consensus), REP – повторяющаяся экстрагенная палиндромная последовательность (repetitive extragenic palindromic sequence), dNTP – дезоксирибонуклеотидтрифосфат (deoxyribonucleotide triphosphate), OTUs – операционные таксономические единицы (operational taxonomic units).

## ВВЕДЕНИЕ

Тело человека и животного содержит значительное количество различных экологических ниш, колонизированных разнообразными популяциями микроорганизмов и их вирусов, составляющими нормальную микрофлору. Для многих видов микробов тело животного или человека является если не единственным, то основным местом обитания [1], но возможно и присутствие нетипичных микроорганизмов [4]. Кишечник животных относится к наиболее плотно колонизированным участкам тела, и здоровье животного или человека напрямую зависит от состава и состояния его кишечной микрофлоры [2]. Одним из наиболее общих для всех млекопитающих животных кишечным микроорганизмом являются *Escherichia coli* – кишечная палочка и родственные ей энтеробактерии, способные в некоторых случаях вызывать миграторные бактериальные заболевания у животных [2].

В настоящее время роль условно-патогенных индигенных микроорганизмов в инфекционной патологии животных

оценивается как весьма значительная. Поскольку многие существенные физиологические и биохимические свойства (чувствительность к фагам, антибиотикорезистентность, продукция токсинов и др.) микроорганизмов являются штаммовыми признаками, необходимы системы, способные надежно дифференцировать микробы на основании их принадлежности к той или иной генетической линии. Анализ популяционных событий, происходящих в природных микробных системах с высокой плотностью жизни, например в толстом кишечнике животных, важен также и для фундаментальных исследований по экологии симбиотических микробных сообществ. Поэтому существует потребность в простых и дешевых молекулярных методах дифференциации штаммов бактерий, пригодных для массового анализа изолятов и в то же время обладающих высокой разрешающей способностью и воспроизводимостью.

Существующие в настоящее время методы типирования штаммов микроорганизмов, основанные на определении фаговой чувствительности и антибиотикорезистентно-

сти, имеют характерные и труднопреодолимые недостатки. Например, фаготипирование бактерий – это весьма трудоемкий и материалоемкий процесс, не пригодный для массового скрининга изолятов, требующий создания и поддержания типизирующих коллекций бактериофагов, что сложно осуществимо в виду огромного штаммового разнообразия индигенной флоры [5, 6, 11, 12, 16]. Гены резистентности к антибиотикам зачастую содержатся в плазмидах, легко теряющихся или приобретаемых в ответ на изменения окружающей среды и на появление новых штаммов микроорганизмов в системе, что вызывает вопросы о стабильности ряда «классических» фенотипических признаков для различных штаммов и зависимости факторов резистентности от состояния окружающей среды [11].

Для молекулярной дифференциации штаммов в настоящее время широко используются универсальные системы ДНК-фингерпринтинга, такие как риботипирование и ПЦР-анализ повторяющихся экстрагенных BOX (rep-ПЦР) и интрагенных (ERIC) последовательностей геномной ДНК [11, 16]. BOX-фингерпринтинг с праймером BOXA1R, специфичным к нуклеотидной последовательности локуса boxA, так же как и ERIC-ПЦР, применяется для определения источников загрязнения воды, для классификации изолятов *E. coli*, выделенных из сточных вод, фекалий лошадей, коров и собак [5, 12]. Сравнительно высокое (70 %) содержание GC-пар в праймерах для BOX и ERIC-ПЦР [10, 11] приводит к тому, что при используемой температуре отжига (52 °C) эти праймеры могут гибридизоваться и инициировать синтез ДНК с частично комплементарной последовательности нуклеотидов. Такой неспецифический отжиг праймеров нестабилен, сильно зависит от температуры, следовательно, высокочувствителен к незначительным отклонениям от режима амплификации, что делает результаты сильно зависящими от качества используемого ДНК-амплификатора. Метод может быть усовершенствован путем повышения температуры отжига, однако тогда параметры BOX и ERIC-ПЦР утрачивают свою универсальность, и праймеры должны быть оптимизированы для каждого рода бактерий в отдельности [10]. Эти особенности делают затруднительным сравнительный анализ профилей BOX и ERIC, полученных различными исследователями и в различных сериях.

Риботипирование аутоштаммов *E. coli* основано на объединении штаммов в группы (риботипы) по признаку общности последовательностей генов 16S рРНК, которые являются универсальными генетическими маркерами [4]. Варианты этого метода включают системы с анализом профилей гидролиза ПЦР-амплифицированного гена 16S рРНК эндонуклеазами рестрикции и системы с секвенированием этих же амплификатов. Гены, кодирующие рРНК, весьма консервативны внутри каждого вида бактерий, что делает практически невозможной внутривидовую дифференциацию. Этот метод не обладает достаточной для вышеизложенных целей разрешающей способностью, зачастую не позволяет получать информацию о таксономическом положении исследуемого микроорганизма глубже видовой принадлежности, равно как и затруднителен с технической точки зрения (стоимость исследования, количество стадий, интерпретация получаемых данных [5]).

Целью нашей работы было создание надежного и удобного в использовании универсального молекулярного ме-

тода экспресс-дифференциации штаммов энтеробактерий, основанного на ПЦР-амплификации последовательностей их геномной ДНК, и апробация нового метода на изолятах, выделенных из реальной микробной системы кишечника животного.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Выделение штаммов колиформных бактерий.** Пробы фекалий лошадей отбирали немедленно после дефекации в стерильные пластиковые контейнеры и сохраняли при температуре -70 °C до обработки. Для выделения колиформных бактерий отбирали пробу массой 15–20 г, размораживали при комнатной температуре в течение 30 мин и добавляли к ней физиологический раствор в соотношении 1 : 4 (вес : объем). Инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре на шейкере для суспензирования микроорганизмов. Далее проводили посевы в разведении 1 : 100 и 1 : 1000 на селективную для энтеробактерий среду ЛТА следующего состава: бакто-триптоза (Difco, США) – 20 г, лактоза – 5 г, NaCl – 5 г, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (безводный) – 2.75 г, KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (безводный) – 2.75 г, додецил-сульфат натрия – 0.1 г, дистиллированная вода – до 1000 мл, pH 6.8.

По 20 выросших на чашках со средой ЛТА колоний аутоштаммов колиформных энтеробактерий из 3 разных образцов перекальвали зубочистками на чашки со средой LB: триптон (Amresco, Испания) – 10 г, дрожжевой экстракт (Difco, США) – 5 г, NaCl – 5 г, бакто-агар (Difco, США) – 15 г, дистиллированная вода – до 1000 мл.

**Приготовление матриц для постановки ПЦР.** В стерильные пробирки Eppendorf добавляли по 100 мкл деионизованной воды. Кончиком бактериальной петли переносили часть бактериальной колонии в пробирку, инкубировали в течение 20 мин в термостате Eppendorf Termostat 5320 при температуре +95 °C, перемешивали на смесителе Vortex, центрифугировали 1 мин при 13000 rpm на настольной центрифуге Eppendorf Centrifuge 5414. Супернатант использовали в качестве матрицы.

**IS1-фингерпринтинг.** Созданный нами праймер IS1tr (Golomidova et al., 2007) имеет следующую последовательность нуклеотидов: (5' ATCAGTAAGTTGGA(G/A)(T/G) CATTACC -3') и отжигается на инвертированные концевые повторы IS1-элементов. ПЦР-смесь (20 мкл) содержала: 67 mM Tris-HCl (pH 8.3), 17 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.001 % Tween 20, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 пкм праймера IS1tr, 0.2 mM dNTP и 1.25 единицы *Taq* полимеразы (Sigma) и 1 мкл исследуемой матрицы. ПЦР проводилась в Mini Personal Thermal Cycler (BIO-RAD) и в циклерах предыдущих поколений Терцик («ДНК-Технология») и Perkin-Elmer Cetus (Perkin-Elmer).

Параметры программы были следующими: денатурация при 94 °C – 30 с; далее 30 циклов, включающих инкубацию при 94 °C, – 15 с, 56 °C – 30 с и 72 °C – 45 с, завершающая стадия проходила при 72 °C – 2 мин.

Анализ продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1 %-ном агарозном геле.

Для улучшения параметров дифференциации штаммов (см. раздел «Результаты и обсуждение») в ряде реакций использовали также следующие разработанные нами праймеры: IS2tr (5'-CAGATGTCTGGARATWYAGGGG-3'), IS3tr-L (5'-CCATATTACGTGGGTAGGATCA-3'), IS3tr-R (5'-CCASTATTGCTGGGTAAGATCA-3'),



IS4tr (5'-TSCTTA ACTGACTGGCATTA-3'), IS5tr (5'SSRCTTRTTCGCACCTTCC-3'), IS30tr (5'-TGTTGCRTTGACMRATTGAATCTACA-3'), TR8D (5'-ATGCACGTCATACTCTTTTTT-3'), TR8R (5'AAGAGTATGACGTGCATCSTA-3'), TR8834 (5'-ATCGGCGATGCGTTGACGAAT-3').

**Rep-ПЦР.** BOX-фингерпринтинг осуществлялся, как это описано авторами метода [15]. Для постановки реакции использовали праймер BOX A1R (5'-СТА CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'). В остальном реакционная смесь имела тот же состав, что и для IS1-ПЦР, однако программа амплификации существенно отличалась. Реакция начиналась с прогрева смеси при 95 °С – 2 мин, далее 30 циклов инкубации при 94 °С – 3 с, 92 °С – 30 с, 50 °С – 1 мин, 65 °С – 8 мин и завершающая стадия – 8 мин при 65 °С, полная программа в 30 циклов занимала около 7 ч. Детекцию результатов ПЦР проводили описанным выше стандартным способом.

**Риботипирование аутоштаммов E.coli.** Гены 16S рРНК были амплифицированы с использованием универсальных для эубактерий праймеров 27F (5'-AGA GTT GAT CMT GGC TCA G -3') и 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') [4]. Для гидролиза продуктов амплификации использовали рестриктазы Hind III и Hae III (Fermentas, Литва). Анализ результатов рестрикции проводили методом электрофореза в 2 %-ном агарозном геле.

Оценку чувствительности изолятов колиформных бактерий к фагам проводили двуслойным методом Грация на среде LB. В качестве верхнего агара использовали среду LB с 0.6 % бакто-агара.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Так как нами была поставлена цель создания надежной и удобной ПЦР-системы высокоразрешающего геномного типирования штаммов колиформных бактерий, очевидной являлась и необходимость тестирования новой системы на сериях полевых изолятов колиформных бактерий. Таким образом, объектом для исследования послужили индигенные энтеробактерии, выделенные из образцов фекалий трех лошадей. Из общего числа колоний, выросших на селективной для энтеробактерий среде LTA, было отобрано 80 различных клонов.

**Система IS1-фингерпринтинга.** Нами была разработана оригинальная система геномного ПЦР-фингерпринтинга [6]. Реакция выполняется на целых клетках, разрушенных нагреванием, без предварительного выделения ДНК. В ней

используется только один олигонуклеотид, отжигающийся на инвертированных терминальных повторах инсерционного геномного элемента IS1, наиболее широко представленного в геноме энтеробактерий [3], причем 3'-конец праймера направлен вовне элемента. Таким образом, происходит амплификация ДНК, находящейся между копиями элемента IS1 и/или присутствующими в геноме сайтами потенциальной гибридизации праймера, не связанными с копиями IS1, которые, возможно, являются остатками утраченных инсерционных элементов. Длина получаемых в реакции продуктов специфической амплификации определяется взаимным расположением IS-элементов и (или) других сайтов гибридизации праймера в хромосоме бактерии и лимитируется максимально возможной длиной фрагмента, синтезируемого в данных условиях ПЦР. Продукты, получаемые в ходе реакции, могут быть разделены и проанализированы обычным ДНК-электрофорезом в агарозном геле [6].

Анализ результатов ПЦР с праймером IS1 показал, что для каждого исследованного аутоштамма колиформных бактерий характерен определенный паттерн полос ПЦР-продукта. Все получаемые полосы хорошо разделяются в агарозном геле. Их число в среднем составляет от двух до десяти, что упрощает процесс сравнения спектров между собой для выявления идентичных или близкородственных IS1-профилей. Так, например, среди аутоштаммов, выделенных из первого образца фекалий, обнаружено 2 идентичных профиля (рис. 1, дорожки 12, 19), а среди выделенных из второго образца – 2 пары идентичных спектров (рис. 1, дорожки 28, 31; дорожки 37, 39). Кроме этого, можно отметить 2 одинаковых паттерна между аутоштаммами из первого и второго образца фекалий (рис. 1, дорожки 20, 30).

## ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ IS1-ФИНГЕРПРИНТИНГА

Проверка устойчивости амплификации геномной ДНК-матрицы к различным физико-химическим факторам показала, что прогревание матрицы при 100 °С в течение 10 мин не оказывает влияния на результат IS1-фингерпринтинга по сравнению с контролем, таким образом, возможные отклонения от режима прогрева при приготовлении образцов не будут иметь существенного влияния на результат. Можно отметить, что матрицы на протяжении всего эксперимента (около 3 мес.) хранились в морозильной камере и часто подвергались оттаиванию и замораживанию – качество и количество ПЦР-продукта IS1-фингерпринтинга



Рис. 1. IS1-фингерпринтинг полевых изолятов колиформных бактерий. Дорожки 1–20 – штаммы, полученные из образца фекалий № 1. Дорожки 21–22 – штаммы, полученные из образца фекалий № 2. Z – *E. coli* Z85; Bl – *E. coli* BL21. Маркер – 1kb DNA ladder (Fermentas)



при этом не менялось, равно как не менялся и получаемый паттерн полос. Вместе с тем следует отметить, что внесение чрезмерно большого количества лизированной нагретом биомассы бактерий может приводить к ингибированию ПЦР, что требует постановки положительного контроля в каждой серии матриц с использованием штамма, заведомо дающего специфический паттерн.

Для проверки стабильности IS1-фингерпринта в ряду поколений был проведен следующий эксперимент: был выбран аутоштамм с легко читаемым IS1-паттерном, который затем провели через 5 последовательных пассажей в жидкой среде LB. Разведения культуры из первого и последнего пассажей были рассеяны шпательем на чашках с твердой средой LB для получения отдельных колоний. IS1-ПЦР случайной выборки клонов (по 20 шт.) показал отсутствие изменений в паттернах субклонов по сравнению с исходным штаммом (рис. 2). Различная интенсивность отдельных полос ДНК после гель-электрофореза связана с ненормированным количеством матрицы в ПЦР. Отсутствие различий между геномными паттернами исходного штамма и его потомков при небольшом числе генераций (около 50) делает предлагаемую систему пригодной для долгосрочных исследований динамики численности отдельных бактериальных штаммов в экотопах кишечника и в других системах.

Система IS1-фингерпринтинга работает одинаково хорошо как в амплификаторе производства компании BIO-RAD (MJ mini Personal Thermal Cycler), так и в широко распространенном в России приборе «Терцик» компании «ДНК-Технология». Для постановки реакции в отечественном приборе «Терцик» необходимо добавление минерального масла поверх ПЦР-смеси во избежание испарения компонентов. Как выход ПЦР-продукта, так и получаемые паттерны полос вполне совпадают. Использование различных видов полимераз *Taq* и *Pfu*, а также их смеси не повлияло на результат (данные не приведены). Таким образом, кинетические характеристики приборов для проведения ПЦР-амплификации не имеют определяющего значения для получаемого результата, что представляется преимуществом перед существующими альтернативными системами штаммового типирования микроорганизмов, такими как ВОХ-ПЦР, более требовательными к качеству используемого оборудования и реактивов. Самый первый коммерчески доступный ПЦР-амплификатор Perkin-Elmer Cetus (год выпуска — 1989) дал сходный выход и идентичный паттерн полос ПЦР-продуктов.

**Сравнительная характеристика методов IS1-фингерпринтинга, ВОХ-фингерпринтинга и риботипирования энтеробактерий.** Новый метод геномного IS1-фингерпринтинга мы сравнивали с уже существующими методами молекулярного ВОХ-фингерпринтинга и риботипирования. Для этого были использованы те же ДНК-матрицы, что и для IS1-ПЦР, и рекомендованные авторами метода [15] сложные оптимизированные программы амплификации. Анализ результатов ВОХ-ПЦР с помощью электрофореза в агарозном геле показал, что амплифицированные фрагменты ДНК слабо разделяются, и их число составляет в среднем от 15 до 20 полос, что затрудняет поиск идентичных профилей без использования специального программного обеспечения. Выход ПЦР-продукта получается меньше, чем при IS1-ПЦР. При оценке профилей были выявлены 4 идентичные группы (по 2–7 профилей) среди аутоштаммов, выделенных из третьего образца фекалий (рис. 3). Таким образом, дискриминирующая способность этой системы, равно как и ее чувствительность, оказываются ниже, чем у предложенной нами системы.

Проведение риботипирования оказалось наиболее трудоемким и требующим материальных затрат процессом по сравнению с ПЦР-системами – ВОХ- и IS1-фингерпринтингом. Этот метод включает в себя как ПЦР-амплификацию необходимого участка ДНК, так и последующий ферментативный гидролиз обессоленного ПЦР-продукта. Полученный результат не дал возможности выделить отдельные группы в пределах данной серии полевых изолятов *E.coli*, что свидетельствует о низкой разрешающей способности метода. Это связано с консервативностью последовательности гена 16S рРНК у отдельных штаммов одного вида бактерий, равно как и с неполным учетом возможных мутаций локуса – при рестрикционном анализе оказывается возможным обнаружить только мутации, затрагивающие тот или иной сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции, анализа всей последовательности, таким образом, не происходит. Альтернативой рестрикции в этом случае может служить секвенирование ДНК – дорогой и медленный метод исследования.

**Использование IS1-ПЦР для различения близких штаммов, отличающихся по чувствительности к бактериофагам.** Восприимчивость к инфицированию отдельными расами фагов является одним из наиболее динамичных свойств бактерий, быстро эволюционирующим как в естественных, так и в лабораторных микробных сообществах. Для того чтобы определить, достаточна ли разрешающая способность



Рис. 2. Проверка стабильности IS1-профиля при пассировании штамма в жидкой среде. Отсутствие клональной изменчивости между субклонами исходного штамма (дорожки 1–20) и его субклонами, полученными после серии из 5 пассажей в жидкой культуре (дорожки 21–40). Маркер – 1 kb DNA ladder (Fermentas)

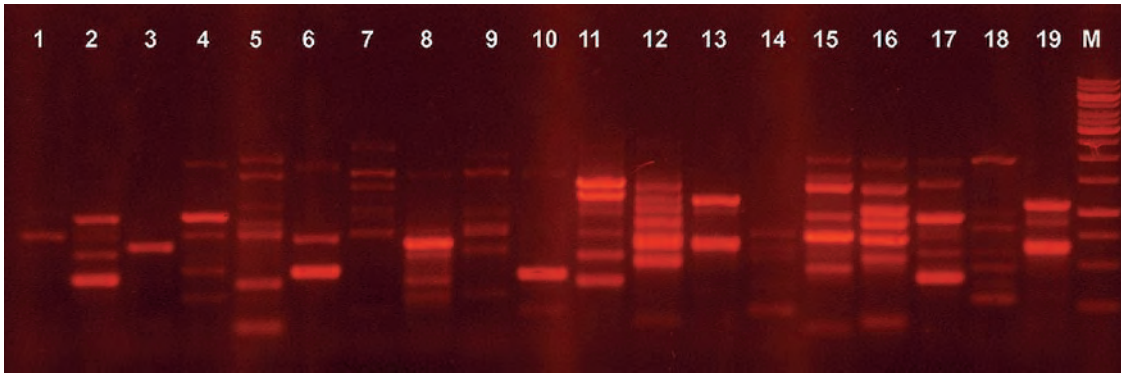


Рис. 3. BOX-фингерпринтинг. Штаммы колиформных бактерий, выделенные из образца фекалий № 3. Маркер – 1kb DNA ladder (Fermentas)

системы IS1-фингерпринтинга для надежного различения близкородственных природных изолятов, различающихся по чувствительности к фагам, присутствующим в тех же сообществах, нами был поставлен следующий эксперимент.

Были выбраны четыре пары аутоштаммов энтеробактерий, выделенных из фекалий лошади: 2 пары идентичных по IS1-профилям (в то же время они имеют одинаковые BOX-профили) и две – идентичных по профилям BOX-ПЦР. Эти аутоштаммы были протестированы на чувствительность к панели из 20 различных по специфичности фагов, ранее выделенных из фекалий лошадей в нашей лаборатории [6]. Зоны фагового лизиса были обнаружены только у изолятов, идентичных по IS1-профилям под действием колифагов № 12 и 17. Следующим шагом было выделение собственных фагов из тех же образцов фекалий, из которых ранее были высеяны исследуемые аутоштаммы энтеробактерий. Было проведено посев экстрактов фекалий на газоны исследуемых штаммов двуслойным методом на среде LB, в результате которого было отобрано 200 фаговых бляшек. Каждый аутоштамм был протестирован на чувствительность к этой выборке фагов. Эксперимент показал, что штаммы, имеющие идентичные профили по BOX-ПЦР, обладают разной чувствительностью к данной выборке фагов и, что интересно, имеют различные IS1-профили. При этом штаммы, идентичные по IS1-профилям, проявляют одинаковую чувствительность к бактериофагам.

Штаммы колиформных бактерий, не дающие ПЦР-продукта с нашей системой, относительно редки и составляют в образцах высокогетерогенных сообществ фекалий лошадей лишь 5–10 % от всех проанализированных штаммов. Однако штаммы, дающие небольшое количество полос, иногда не могут быть дифференцированы с достаточной

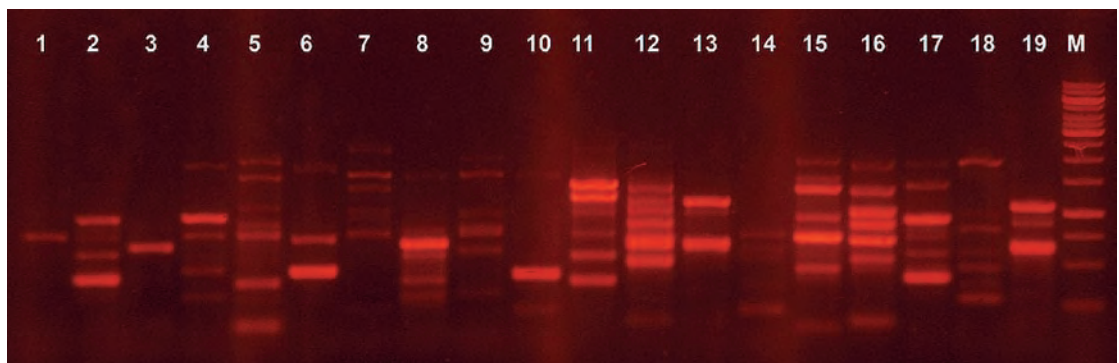
уверенностью.

Для того чтобы увеличить количество полос в паттерне и тем самым улучшить дифференцирующую способность системы, нами были разработаны праймеры, специфичные к инвертированным концевым повторам других, менее распространенных в геноме колиформных бактерий, инсерционных элементов (IS2, IS3, IS4, IS5, IS30), а также праймеры TR8D, TR8R и TR8834, комплементарные последовательностям нуклеотидов в гене транспозазы, который представлен значительным числом копий в геномах многих штаммов *E. coli*.

Постановка ПЦР с этими праймерами проводилась согласно методике, описанной выше. Реакции были поставлены с различными комбинациями олигонуклеотидов, однако наилучший результат был получен при использовании одновременно праймеров IS1 и TR8834. Аутоштаммы, дававшие при IS1-фингерпринтинге 2–3 полосы на электрофореze ПЦР-продукта (рис. 4), после ПЦР с парой праймеров IS1+TR8834 могли быть намного легче дифференцированы благодаря паттернам из 5–7 полос (рис. 5). Программа ПЦР с данной комбинацией праймеров не отличается от программы использованной для IS1-фингерпринтинга. Мы сравнили усовершенствованную систему с BOX-ПЦР и методом риботипирования, поставив реакции с теми же матрицами, и убедились в преимуществе ее использования перед этими методами.

Столь высокая разрешающая способность системы маскирует более дистантное родство все же генетически родственных штаммов. Это обстоятельство делает практически невозможным классификацию профилей IS1 фингерпринтинга на операционные таксономические единицы (OTUs) или построение на их основе филогенетических деревьев,

Рис. 4. IS1-фингерпринтинг. Штаммы, идентичные штаммам с рис. 3. Маркер – 1kb DNA ladder (Fermentas)



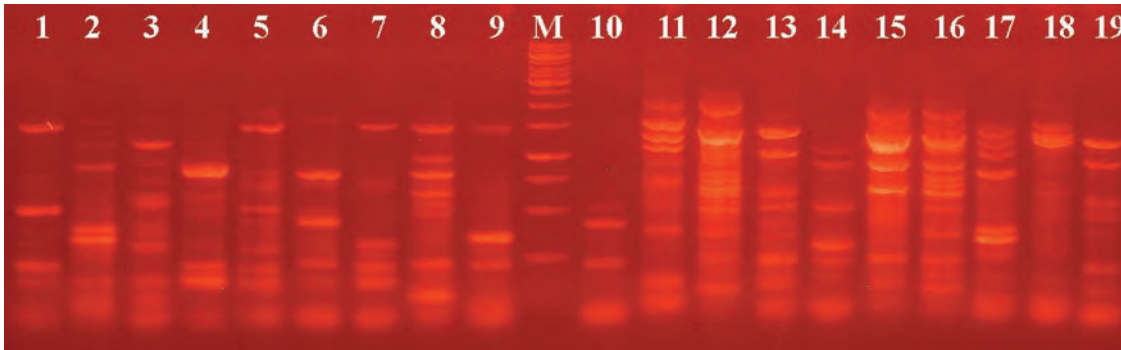


Рис. 5. Фингерпринтинг с праймерами IS1 и TR8834. Штаммы, идентичные штаммам с рис. 3, 4. Маркер – 1kb DNA ladder (Fermentas)

как это принято при использовании других систем ПЦР-фингерпринтинга – таких как ERIC-ПЦР [9] или BOX-ПЦР. Это ограничивает применимость нашей системы для ряда приложений, таких как поиск санитарно-показательных штаммов энтеробактерий, указывающих на источник фекального загрязнения [5]. Кроме того, IS1-профиллинг, ориентированный на энтеробактерии группы кишечной палочки, является менее универсальным по спектру исследуемых микробов, чем вышеперечисленные системы. Несмотря на введенные нами усовершенствования, имеется определенная небольшая доля штаммов, нетипируемых нашим методом (ПЦР-амплификация отсутствует).

В то же время высокая разрешающая способность разработанной нами системы, сравнимая с фаготипированием, делает ее «методом выбора» при исследовании микроэкологии бактериофагов энтеробактерий в естественных микробных системах, таких как кишечник животных или сточные воды. В таких местообитаниях часто создаются условия, способствующие быстрой совместной микроэволюции фагов и их хозяев, что приводит к необычно высокой степени гетерогенности популяций бактерий на штаммовом уровне [14, 20]. В результате даже близкородственные штаммы могут существенно различаться по чувствительности

к присутствующим в экосистеме бактериофагам [6, 8]. Очевидно, что высокая разрешающая способность системы, наряду с отличной воспроизводимостью результатов, могут быть крайне полезны и для целого ряда других задач, например, при прослеживании эпидемиологических цепочек распространения штаммов патогенных энтеробактерий среди людей или животных.

### ВЫВОДЫ

Таким образом, предложенная нами система быстрого генетического ПЦР-фингерпринтинга энтеробактерий является существенным дополнением к существующему инструментарию молекулярной дифференциации энтеробактерий, позволяющая решать задачи, связанные с детализированным исследованием высокогетерогенных и быстро эволюционирующих естественных популяций этих микробов. ●

Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК № 02.740.11.0313), Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 09-04-01482-а) и программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кисленко В.Н., Колычев Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология. Ч. 1. Общая микробиология // М.: КолосС, 2006. С. 124–129.
2. Berg R.D. The indigenous gastrointestinal microflora // Trends in Microbiology. 1996. Vol. 4. № 11. P. 430–435.
3. Blot M. Transposable elements and adaptation of host bacteria // Genetica. 1994. 93. P. 5–12.
4. Daly K., Stewart C.S., Flint H.J. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes // FEMS Microbiology Ecology. 2001. № 38. P.141–151.
5. Dombek P.E., Johnson L.K., Zimmerly S.T. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources // Applied and Environmental Microbiology. 2000. V. 66. № 6. P. 2572–2577.
6. Golomidova A., Kulikov E., Isaeva A., Manykin A., Letarov A. The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions // Applied and Environmental Microbiology. 2007. V. 73. №.19. P. 5975–5981.
7. Hartl D.L., Boyd E.F. Nonrandom location of IS1 elements in the genomes of natural isolates of *Escherichia coli* // Molecular Biology and Evolution. 1997. 14. P. 725–732.
8. Holmfeldt K., Middelboe M., Nybroe O., Riemann L. Large variabilities in host strain susceptibility and phage host range govern interactions between lytic marine phages and their *Flavobacterium* hosts // Applied and Environmental Microbiology. 2007. 73. P. 6730–6739.
9. Hulton C.S., Higgins C.F., Sharp P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria // Molecular Microbiology. Apr. 1991. V. 5. № 4. P. 825–834.
10. Johnson J.R., Clabots C. Improved repetitive – element PCR fingerprinting of *Salmonella enterica* with the use of extremely elevated annealing temperatures // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Mar. 2000. P. 258–264.
11. Johnson J.R., O'Bryan T.T. Improved repetitive – element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli* // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Mar. 2000. P. 265–273.
12. Johnson L.K., Brown M.B., Carruthers E.A. Sample size, Library composition, and Genotypic Diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution // Applied and Environmental Microbiology. 2004. P. 4478–4485.
13. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In «Nucleic acid techniques in bacterial systematics» // Stackebrandt E. and Goodfellow M. (eds.), United Kingdom, Chichester, John Wiley and Sons. 1991. P. 115–147.
14. Poullain V., Gandon S., Brokhurst M.A., Buckling A., Hochberg M.E. The evolution of specificity in evolving and coevolving antagonistic interactions between a bacteria and its phage. // Evolution. 2008. V. 62. № 1. P. 1–11.
15. Rademarker J.L.W., and de Bruijn F.J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computerassisted pattern analysis. In «DNA markers: protocols, applications, and overviews» // Caetano-Anolles G. and Gresshoff P.M. (eds.). New York, 1997. P. 151–171.
16. Seurinck S., Verstraete W., Siciliano S.D. Use of 16S – 23S rRNA intergenic spacer region PCR and repetitive extragenic palindromic PCR analyses of *Escherichia coli* isolates to identify nonpoint fecal sources // Applied and Environmental Microbiology. 2003. P. 4942–4950.
17. Shapiro J.A. Mobile genetic elements // Academic Press, Inc. New York, 1983. P. 192.
18. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes // Nucleic Acids Res. 1991. 19. P. 6823–6831.
19. Vizvar'yova M., Valkova D. Transposons – the useful genetic tools // Biologia. Bratislava. 2004. 59. № 3. P. 309–318.
20. Weitz J.S., Hatman H., Levin S.A. Coevolution arms races between bacteria and bacteriophage // Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. 102. P. 9535–9540.
21. Woods C.R., Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Whole – cell repetitive element sequence – based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates // Journal of clinical microbiology. 1993. P. 1927–1931.



УДК 577.151:616.006.04

# Противоопухолевое и антиметастатическое действие РНКазы А и ДНКазы I

О.А. Патутина<sup>1</sup>, Н.Л. Миронова<sup>1</sup>, Е.И. Рябчикова<sup>1</sup>, Н.А. Попова<sup>2</sup>, В.П. Николин<sup>2</sup>,  
В.И. Каледин<sup>2</sup>, В.В. Власов<sup>1</sup>, М.А. Зенкова<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090,  
Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 8

<sup>2</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 11

\*E-mail: marzen@niboch.nsc.ru

**РЕФЕРАТ** В данной работе на двух моделях метастазирующих опухолей мышей, карциноме легких Льюис и гепатоме А1 исследовано противоопухолевое и антиметастатическое действие РНКазы А и ДНКазы I. Обнаружено, что РНКаза А при внутримышечном введении в дозах 0.1–50 мкг/кг замедляет рост первичной опухоли на 20–40 %, а при повышении дозы до 0.5 мг/кг и выше эффект исчезает. Противоопухолевой активности ДНКаза I обнаружено не было. Внутримышечное введение РНКазы А (0.35–7 мкг/кг) или ДНКазы I (0.02–2.3 мг/кг) приводит к значительному снижению числа метастазов в легких у животных с карциномой легких Льюис и снижению печеночного индекса у животных с гепатомой А1. Гистологическое исследование органов показало, что введение РНКазы А или ДНКазы I приводит к патоморфозу метастазов, что выражается в разрушении опухолевых клеток, увеличении числа некрозов и апоптозов в очагах метастазирования, а также их инфильтрации лимфоцитами. Полученные данные показывают, что РНКаза А и ДНКаза I могут быть использованы в качестве терапии сопровождения при лечении метастазирующих форм опухолей.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** антиметастатическая активность, ДНКаза I, РНКаза А, карцинома легких Льюис, гепатома 1А.  
**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** карцинома легких Льюис (LLC), гепатома 1А (HA-1).

## ВВЕДЕНИЕ

Недавно полученные данные об участии малых некодирующих РНК в канцерогенезе [1–3] и опухолеспецифических ДНК в метастазировании («геном-генометастатическая гипотеза») [4] позволили по-новому взглянуть на ферменты, способные расщеплять нуклеиновые кислоты, как на возможные противоопухолевые и антиметастатические препараты.

В мире широким фронтом ведутся исследования противоопухолевого потенциала экзогенных рибонуклеаз. На сегодняшний день продемонстрирован высокий противоопухолевый потенциал BS-РНКазы [5–8] и онконазы [9–11], относящихся к семейству РНКазы А. Однако первые исследования противоопухолевой активности рибонуклеаз этого семейства были проведены именно с РНКазой А [12–14]. Полученные в этих экспериментах данные оказались противоречивыми. В ряде работ была продемонстрирована ее высокая противоопухолевая активность [12, 13], тогда как в других – полное отсутствие [14, 15]. Исследователи связывали отсутствие противоопухолевого действия РНКазы А с ее инактивацией под действием рибонуклеазного ингибитора [16, 17], взаимодействием с которым способны избегать онконазы и BS-РНКаза и за счет этого оказывать цитотоксическое действие на опухолевые клетки [18–20]. Антиметастатический потенциал ДНКазы I был продемон-

стрирован *in vivo* на модели опухоли L5178Y-ML, метастазирующей в печень [21, 22]. Однако использование ДНКазы I в качестве агента адъювантной терапии при лечении рака не получило распространения.

В данной работе на двух моделях опухолей мышей – карциноме легких Льюис (LLC), метастазирующей в легкие, и гепатоме 1А (HA-1), метастазирующей в печень, мы исследовали противоопухолевое и антиметастатическое действие ферментов РНКазы А и ДНКазы I. Оказалось, что внутримышечное введение РНКазы А в диапазоне доз 0.1–50 мкг/кг приводит к замедлению роста опухоли на 20–40 %. Введение РНКазы А или ДНКазы I приводит к двух-трехкратному снижению количества метастазов в легких (в случае LLC) и снижению печеночного индекса (в случае HA-1). Проведенный гистологический анализ показал, что введение ферментов приводит к разрушению опухолевых клеток, увеличению числа некрозов и апоптозов в очагах метастазирования и их инфильтрации лимфоцитами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали РНКазу А (13700 г/М) и ДНКазу I (2.155 КУ/мг) производства Sigma (USA); [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]аденозин-5'-трифосфат ([ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ) (3000 Ки/ммоль) производства компании «Биосан» (Россия), Т4 полинуклеотидкиназу

фирмы Fermentas (Литва). Плазмида pHIV-2 была любезно предоставлена профессором Г.Дж. Гроссом (University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany).

Опухолевые штаммы LLC и HA-1 были получены из виария Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия.

Введение радиоактивной метки по 5'-концу фрагмента РНК HIV-1, полученного с помощью транскрипции *in vitro*, проводили с помощью  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  АТФ и T4 полинуклеотидкиназы [23].

**Определение ферментативной активности РНКазы А.** Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 50 000 срт 5'- $^{32}\text{P}$ -меченной РНК,  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  М РНКазы А, 50 мМ Tris – HCl, pH 7.0, 200 мМ KCl, 1 мМ EDTA и 100 мкг/мл РНК-носителя, инкубировали при 37 °С в течение 1–15 мин. После окончания инкубации реакционные смеси экстрагировали фенолом, и РНК из водной фазы осаждали 96 %-ным этанолом. Продукты расщепления РНК анализировали с помощью электрофореза в 12 %-ном денатурирующем полиакриламидном геле.

**Определение ферментативной активности ДНКазы I.** Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 0.2 мкг плазмидной ДНК pHIV-2, 0.01–1 ед. акт. ДНКазы I, 10 мМ Tris – HCl, pH 7.5, 2.5 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 0.1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , инкубировали при 37 °С в течение 1–15 мин. Реакцию останавливали нагреванием реакционной смеси при 60 °С в течение 10 мин. Продукты расщепления ДНК анализировали электрофорезом в 1 %-ном агарозном геле.

**Опухолевые модели.** Самок мышей C57Bl/6 (возрастом 10–11 недель) и самок мышей A/Sn (возрастом 12–14 недель) содержали группами по 8–10 особей в пластиковых клетках в условиях нормального освещения. Животные имели свободный доступ к воде и пище. Все процедуры с животными проводили в соответствии с одобренными методиками и рекомендациями для обращения с лабораторными животными [European Communities Council Directive 86/609/CEE].

Для развития опухолей LLC или HA-1 в солидной форме опухолевые клетки LLC или HA-1 ( $10^6$  кл./животное) внутримышечно прививали мышам C57Bl/6J или A/Sn, соответственно, в бедренную мышцу.

**Исследование влияния внутримышечного введения РНКазы А и ДНКазы I на первичную опухоль и метастазы.** На 4-й или 8-й день после имплантации клеток опухоли LLC мышам C57Bl/6J животных делили на группы и проводили ежедневные внутримышечные инъекции: группе 1 (контроль) – физиологического раствора, группам 2–9 – РНКазы А в физиологическом растворе (0.1 мл) в дозах 0.1, 0.5, 1, 10, 50 мкг/кг и 0.5, 1 и 10 мг/кг, соответственно; группам 10–13 – ДНКазы I в физиологическом растворе (0.1 мл) в дозах 0.02, 0.23, 1.15 и 2.3 мг/кг, соответственно.

В случае HA-1 на 8-й день после имплантации клеток опухоли HA-1 мышам линии A/Sn животных делили на группы и проводили внутримышечные инъекции: группе 1 (контроль) – физиологического раствора, группам 2–4 – РНКазы А в физиологическом растворе (0.1 мл) в дозах 0.35, 0.7 и 7 мкг/кг, соответственно; группам 5–9 – ДНКазы I в физиологическом растворе (0.1 мл) в дозах 0.02, 0.23, 1.15 и 2.3 мг/кг, соответственно.

В течение эксперимента животные получали 8–10 инъекций растворов ферментов или физиологического раство-

ра. Размер опухолей измеряли с помощью штангенциркуля каждые три дня, и объем опухолей рассчитывали по формуле:  $V = (\pi/6 \times \text{длина} \times \text{ширина} \times \text{высота})$  [24].

На 20-й день после имплантации опухолей животных подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков. Печень мышей A/Sn с HA-1 взвешивали и определяли печеночный индекс (PI) по формуле  $PI = (\text{вес печени} / \text{вес мышцы}) \times 100 \%$ . Средний прирост веса печени (ALI) за время развития опухоли считали как разницу между средним значением PI в экспериментальной группе и PI здоровых животных, который равен 4.5 % для мышей A/Sn. Эффективность лечения (TE) считали по формуле  $TE (\%) = 100 - ALI_{\text{эксп}} / ALI_{\text{контроль}} \times 100 \%$ .

Легкие животных с LLC и печень животных с HA-1 фиксировали в 4 %-ном параформальдегиде для дальнейшего гистологического анализа. Количество метастазов в легких животных с LLC подсчитывали под бинокуляром.

**Гистологический анализ.** Фиксированные легкие и печень обрабатывали обычным способом и заливали в парафиновые блоки. Гистологические срезы (толщиной 5 мкм) получали с помощью микротомы и окрашивали гематоксилином и эозином. Патоморфологическое исследование препаратов проводили с помощью визуализации под микроскопом Axioimager Z (ZEISS).

**Статистический анализ.** В случае когда данные отвечали условиям нормальности, статистическую обработку выполняли, используя критерий Стьюдента. В иных случаях статистическую обработку результатов проводили с помощью непараметрического анализа, используя критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Выбор диапазона доз РНКазы А и ДНКазы I для экспериментов *in vivo*.**

Поскольку предполагалось, что ферментативная активность РНКазы А и ДНКазы I важны для проявления ими противоопухолевого действия, в экспериментах *in vitro* были определены концентрации ферментов, при которых достигается 50 %-ное расщепление субстрата за относительно короткое время.

Для этого  $^{32}\text{P}$ -РНК ( $10^{-5}$  М) инкубировали в присутствии  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  М РНКазы А при 37 °С в течение 1–15 мин. Анализ кинетики расщепления РНК показал, что 50 %-ное расщепление субстрата достигается при концентрации РНКазы А  $10^{-9}$  М за 10 мин. Аналогично было найдено, что 50 %-ное расщепление ДНК-субстрата достигается при концентрации ДНКазы I 10 ед. акт./мл за 1 мин. Эти концентрации РНКазы А и ДНКазы I были взяты в качестве исходных для выбора диапазона доз ферментов в экспериментах *in vivo*.

## ВЛИЯНИЕ РНКАЗЫ А И ДНКАЗЫ I НА РОСТ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ

**Внутримышечное введение РНКазы А мышам C57Bl/6J с LLC.** Способность РНКазы А влиять на рост первичной опухоли была исследована в экспериментах на мышах C57Bl/6J с LLC. На 4-й день после трансплантации опухоли животные получали ежедневные внутримышечные инъекции физиологического раствора (контроль) или рас-

твора РНКазы А в диапазоне доз от 0.1 мкг до 10 мг на кг веса животного (эксперимент).

На рис. 1А представлено изменение размеров опухолей в течение эксперимента в зависимости от дозы РНКазы А. Как видно из представленных данных, в группах животных с LLC, получавших лечение РНКазой А в дозах 0.5–50 мкг/кг, наблюдается замедление роста опухолей. На 8-й день после трансплантации LLC объем опухоли в этих группах мышей был на 20–40 % меньше, чем в контроле. К 11-му дню объем опухолей в тех же группах был меньше на 23–33 %, а к 13-му дню – на 16 % меньше, чем размер опухолей в контроле. В группах животных, получавших лечение РНКазой А в дозах свыше 0.5 мг/кг, ингибирования роста опухоли не наблюдалось (рис. 1А).

**Внутримышечное введение РНКазы А мышам А/Sn с НА-1.** Для того чтобы проверить, что противоопухолевая активность РНКазы А не является специфичной для конкретного типа опухоли, была исследована противоопухолевая активность этого фермента и на другой модели опухоли, гепатоме А1, на мышах А/Sn. Поскольку на модели LLC заметная активность РНКазы А наблюдалась в диапазоне доз 0.5–50 мкг/кг, в эксперименте с НА-1 также был использован этот диапазон доз. В этих экспериментах мыши С57В1/6J с LLC были использованы в качестве положительного контроля. Начиная с 8-го дня после имплантации опухолей, когда опухоли уже начинали пальпироваться, мыши с НА-1 или с LLC получали внутримышечные инъекции физиологического раствора или раствора РНКазы А в дозах 0.35, 0.7 и 7 мкг/кг.

Сравнение размера опухоли в контрольной группе и группах животных с LLC или НА-1, получавших лечение РНКазой А, показало, что в начальный период лечения (на 10-й день после трансплантации опухоли) размеры опухолей между группами различаются незначительно (рис. 1Б, 1В). К 15-му дню в группах животных с НА-1, получавших лечение РНКазой А в дозах 0.35 и 0.7 мкг/кг, размер опухоли был на 23 % меньше, чем в контроле (рис. 1В), а в группах животных с LLC – на 43 % меньше, чем в контроле (рис. 1Б). Следует отметить, что противоопухолевый эффект РНКазы А на модели LLC не зависел от того, на какой день (4-й или 8-й) после имплантации опухоли начиналось лечение. **Внутримышечное введение ДНКазы I мышам С57В1/6J с LLC и мышам А/Sn с НА-1.** Противоопухолевый потенциал ДНКазы I был исследован на двух моделях опухолей LLC и НА-1. Начиная с 8-го дня после трансплантации опухолей мышам С57В1/6J с LLC и мышам А/Sn с НА-1 внутримышечно вводили ДНКазу I в диапазоне доз 0.02–2.3 мг/кг. Измерение размера опухоли показало, что введение ДНКазы I не вызывает снижения скорости роста первичной опухоли.

### ВЛИЯНИЕ РНКАЗЫ А И ДНКАЗЫ I НА РАЗВИТИЕ МЕТАСТАЗОВ

Антиметастатическую активность РНКазы А и ДНКазы I (способность снижать число метастазов в органах-мишенях) оценивали, (1) определяя количество метастазов в легких животных с LLC с помощью бинокуляра; (2) оценивая изменение веса печени (печеночный индекс) у животных с НА-1; (3) с помощью гистологического анализа органов-мишеней (легких в случае LLC и печени в случае НА-1).

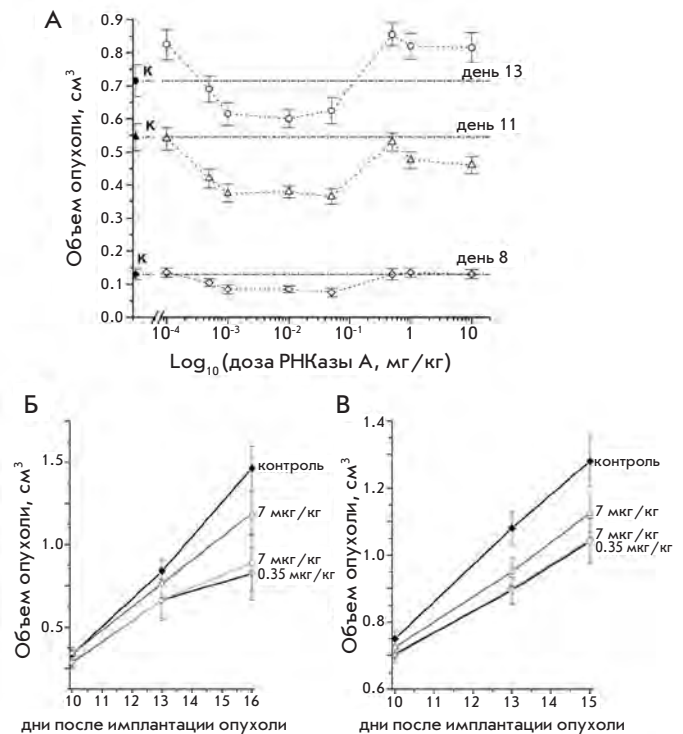


Рис. 1. Противоопухолевая активность РНКазы А. А. Влияние РНКазы А на рост первичной опухоли LLC у мышей С57В1/6J (концентрационная зависимость). В. Влияние РНКазы А в дозах 0.35, 0.7 и 7 мкг/кг на скорость роста первичной опухоли LLC у мышей С57В1/6J. С. Влияние РНКазы А в дозах 0.35, 0.7 и 7 мкг/кг на скорость роста первичной опухоли НА-1 у мышей А/Sn

### ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕТАСТАЗОВ В ЛЕГКИХ ЖИВОТНЫХ С LLC И ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ С НА-1

Образование метастазов в легочной ткани является отличительной чертой LLC. В легких контрольных мышей были обнаружены отчетливые метастазы и множественные группы опухолевых клеток (рис. 2А1, 2А2). Метастазы локализовались преимущественно в субплевральной области и имели разный размер и неправильную форму. В больших метастазах, охватывавших несколько бронхов и крупных сосудов, наблюдались признаки мононуклеарной инфильтрации (рис. 2А1). Поверхностные метастазы состояли из двух-трех слоев опухолевых клеток, расположенных вдоль плевры.

Развитие массивных метастазов в печени является отличительной чертой прогрессии НА-1. На гистологических срезах печеночной ткани выявлено множество метастазов различного размера (рис. 2А3). Было отмечено несколько морфологических типов метастазов: (1) метастазы с отчетливой внешней границей, имеющие псевдогранулярную структуру, состоящую в центре из светлых, плотно расположенных клеток, а по периферии – из базофильных клеток; (2) свободные скопления базофильных опухолевых клеток под печеночной капсулой; (3) небольшие клеточные объединения, состоящие из темных базофильных опухолевых клеток. В печеночной ткани мышей с НА-1 наблюдались многочисленные митозы в метастазах, одиночные



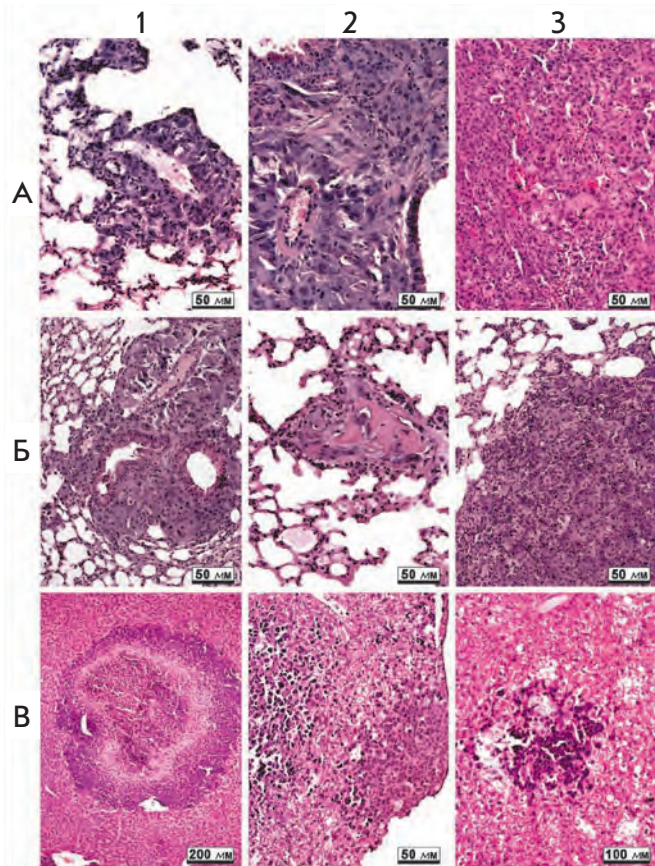


Рис. 2. А. Метастазы в легких животных с LLC (A1 и A2) и печени животных с HA-1 (A3). В. Метастазы в легких животных с LLC после лечения ДНКазой I (0.12 мг/кг) (B1) и РНКазой А (0.7 мкг/кг) (B2 и B3). С. Метастазы в печени животных с HA-1 после лечения ДНКазой I (0.02 мг/кг) (C1), ДНКазой I (1.2 мг/кг) (C2) и РНКазой А (0.35 мкг/кг) (C3)

рассеянные опухолевые клетки, лимфоцитарная инфильтрация печеночной паренхимы, дистрофические изменения и некрозы гепатоцитов (рис. 2А3).

### ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕТАСТАЗОВ В ЛЕГКИХ ЖИВОТНЫХ С LLC И ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ С НА-1, ПОЛУЧАВШИХ ЛЕЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАМИ

Введение РНКазы А и ДНКазы I животным с LLC индуцировало появление дистрофических изменений в метастазах легких (рис. 2Б). Морфологические параметры этих изменений были идентичны для всех групп независимо от дозы: увеличение количества некрозов и апоптозов, дистрофические изменения онкоцитов, значительная мононуклеарная инфильтрация опухолевых экстравазатов и метастазов (рис. 2Б1–3).

Гистологическое исследование метастазов в печеночной ткани у мышей с НА-1 после лечения РНКазой А и ДНКазой I в различных дозах выявило отчетливые морфологические изменения, которые имели идентичные признаки. В метастатических очагах наблюдалось формирование центральных и перифокальных некрозов, отеки ткани,

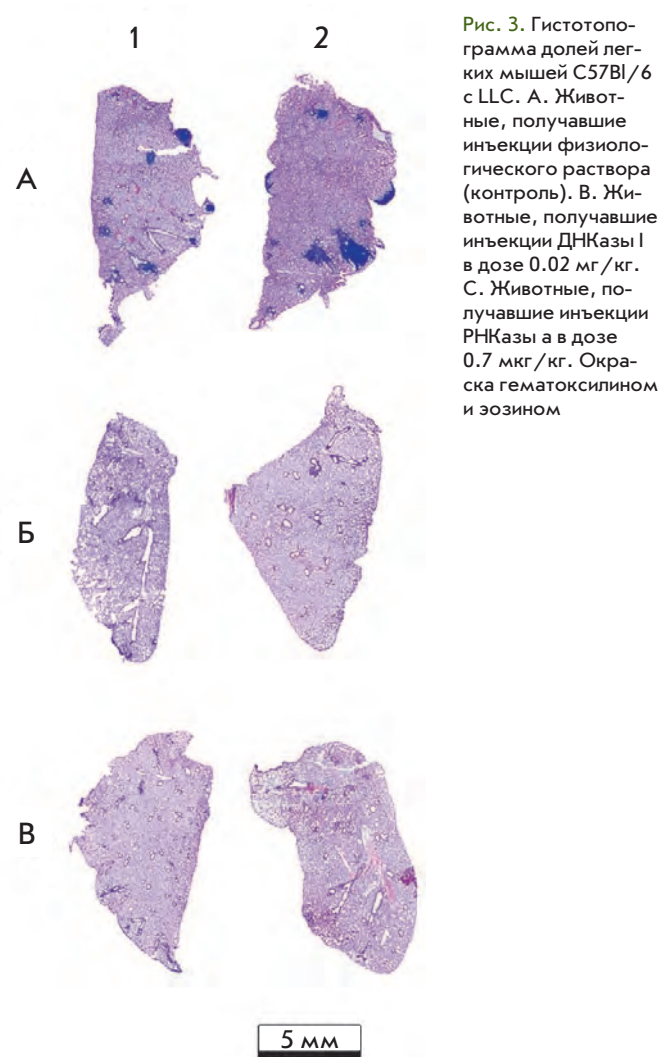


Рис. 3. Гистотопограмма долей легких мышей С57В1/6 с LLC. А. Животные, получавшие инъекции физиологического раствора (контроль). В. Животные, получавшие инъекции ДНКазы I в дозе 0.02 мг/кг. С. Животные, получавшие инъекции РНКазы а в дозе 0.7 мкг/кг. Окраска гематоксилином и эозином

множественные кровоизлияния и отчетливая мононуклеарная инфильтрация (рис. 2В1–3). Следует отметить, что у мышей с НА-1, получавших лечение ферментами, метастазы не были выявлены в миокарде и почках, тогда как у контрольных животных в этих органах были выявлены опухолевые инфильтраты.

Обращает на себя внимание состояние органов иммунной системы у животных с НА-1. В частности, в вилочковой железе прослеживались признаки акцидентальной инволюции, проявляющейся или повышением количества лимфоцитов в мозговом слое, или даже инверсией слоев тимуса. Аналогичные изменения, свидетельствующие о выраженной антигенной стимуляции, были обнаружены в ткани селезенки. Степень выраженности признаков антигенной стимуляции коррелировала с дозой фермента.

Таким образом, при сравнении групп контрольных животных с LLC или НА-1 и групп животных с опухолями, получавших лечение РНКазой А и ДНКазой I, выявлены признаки индуцированного патоморфоза метастазов, проявляющиеся в выраженных дистрофических изменениях опухолевых клеток и усилении мононуклеарной инфильтрации.

Таблица 1. Печеночный индекс (НИ), средний прирост веса печени (АЛІ) и терапевтическая эффективность (ТЕ) в группах мышей А/Sn с НА-1

	Контроль	Здоровые мыши	РНКаза А, мкг/кг			ДНКазы I, мг/кг			
			0.35	0.7	7	0.02	0.23	0.12	2.3
<sup>1</sup> НИ, %	6.7 ± 0.3	4.5	5.9 ± 0.2	6.0 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.5 ± 0.3	5.8 ± 0.2	5.6 ± 0.3	5.7 ± 0.2
<sup>2</sup> АЛІ, %	2.2	–	1.3	1.5	1.4	1.0	1.3	1.1	1.2
<sup>3</sup> ТЕ, %	0	–	42	30	38	53	40	52	46

<sup>1</sup> НИ = (вес печени / вес мыши) × 100 %;

<sup>2</sup> АЛІ (%) =  $\frac{НИ_{эксперимент} - НИ_{здоровых\ животных}}{НИ_{эксперимент}}$  × 100.

<sup>3</sup> ТЕ (%) =  $100 - \frac{АЛІ_{эксперимент}}{АЛІ_{контроль}} \times 100$ .

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА МЕТАСТАЗОВ В ЛЕГКИХ ЖИВОТНЫХ С LLC ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАМИ

Микроскопическое исследование метастазов на поверхности легких животных с LLC показало, что лечение животных с LLC ферментами приводит к значительному снижению числа метастазов. В группах животных с LLC, получавших лечение РНКазой А в дозах 0,5, 0,7 и 10 мг/кг, среднее число метастазов составило 14 ± 3, 15 ± 4 и 18 ± 4 соответственно. В группах животных с LLC, получавших лечение ДНКазой I в дозах 0,02, 0,12 и 2,3 мг/кг, среднее число метастазов составило 10 ± 4, 16 ± 7 и 18 ± 4, тогда как в группе животных, не получавших лечения, среднее число метастазов было 30 ± 5. Таким образом, наблюдаемое количество метастазов в группах животных с LLC, получавших лечение ферментами, было в 2–3 раза меньше по сравнению с контролем.

Анализ метастазов в легких животных с LLC показал, что после лечения ферментами наряду с морфологическими изменениями в метастазах и значительным уменьшением их количества наблюдается также существенное уменьшение площади метастазов и их локализация в органе. На рис. 3 приведены легкие животных с LLC, не получавших лечения (рис. 3А), и легкие животных с LLC, получавших лечение ферментами (рис. 3Б и 3В). Отчетливо видно уменьшение количества метастатических очагов и площади метастазов.

### ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАМИ ЖИВОТНЫХ С НА-1

Диффузная граница метастатических очагов в печеночной паренхиме не позволяла использовать микроскопию для подсчета количества метастазов в печени животных с НА-1. Поскольку в процессе развития опухолей, метастазирующих в печень, происходит увеличение веса печени, для оценки антиметастатической активности ферментов был использован печеночный индекс (НИ),  $НИ = \frac{\text{вес печени}}{\text{вес мыши}} \times 100\%$ , который отражает тяжесть заболевания: уменьшение НИ животных после лечения ферментами относительно НИ животных контрольной группы является критерием терапевтической эффективности лечения (ТЕ). Данные по среднему приросту веса печени (АЛІ) животных в группах с НА-1 относительно здоровых животных были использованы для оценки ТЕ (табл. 1). Из представленных данных видно, что у животных с НА-1, получавших лечение ферментами, наблюдается заметное

снижение НИ по сравнению с контролем. Терапевтическая эффективность (ТЕ) у животных с НА-1, получавших лечение РНКазой А, варьировала от 30 до 42 % и у животных с НА-1, получавших лечение ДНКазой I, – от 40 до 53 %.

Как упоминалось во введении для главного представителя семейства, панкреатической рибонуклеазы А, при высоких дозах фермента (свыше 10 мг/кг) была ранее показана лишь слабая противоопухолевая активность [14, 15], а для ДНКазы I была показана способность подавлять рост метастазов [21, 22].

### ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы исследовали противоопухолевую и антиметастатическую активность РНКазы А *in vivo*, используя дозы от 0,1 мкг/кг до 10 мг/кг. Мы показали, что внутримышечное введение РНКазы А в дозах 0,5–50 мкг/кг приводит к замедлению роста первичной опухоли на 20–40 %, при этом противоопухолевый эффект более выражен на ранних стадиях развития опухоли (8-й день). РНКазы А в дозах свыше 0,5 мг/кг не влияла на рост опухоли, что согласуется с полученными ранее данными других исследователей [17, 25]. Введение ДНКазы I в дозах 0,02–2,3 мг/кг не приводило к замедлению роста первичной опухоли. Было обнаружено, что внутримышечное введение и РНКазы А и ДНКазы I приводит к значительному (в 2–3 раза) уменьшению числа и размеров метастазов в легких животных с LLC. В случае гепатомы НА-1 внутримышечное введение ферментов приводило к снижению веса печени животных по сравнению с контролем, а терапевтическая эффективность лечения составила 30–42 % для РНКазы А, и 40–53 % для ДНКазы I. Гистологический анализ легких и печени позволил выявить, что оба фермента оказывают сходное действие на очаги метастазирования и вызывают деструкцию опухолевых клеток и увеличение числа некрозов и апоптозов в очагах метастазирования. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что оба фермента проявляют высокую антиметастатическую активность.

На сегодняшний день отсутствует общепринятый механизм противоопухолевого действия рибонуклеаз. Наблюдаемый нами противоопухолевый эффект РНКазы А может реализовываться благодаря (1) деградации кодирующих внутриклеточных РНК и, как следствие, (а) нарушению синтеза белков [26, 27] и (б) изменению профиля экспрессии генов под действием продуктов расщепления РНК [28]; (2) деградации некодирующих РНК (pre-miРНК, miРНК

и siРНК [2, 29]; (3) дестабилизации структуры РНК [30]; (4) блокированию функций РНК [31]; (5) воздействию на пути сигналинга [32–34] и (6) выключению неконтролируемого потока калия через кальций-зависимые калиевые каналы в опухолевые клетки [35]. Также нельзя исключить какие-либо другие пока неизвестные механизмы.

Мы предполагаем, что антиметастатическое действие РНКазы А и ДНКазы I, так же как и противоопухолевое действие РНКазы А, связано с основной функцией этих ферментов, способностью расщеплять нуклеиновые кислоты. Однако нельзя утверждать, что противоопухолевый эффект РНКазы А реализуется за счет дегградации внутриклеточной РНК опухолевых клеток, поскольку данные многих авторов однозначно подтверждают, что при проникновении РНКазы А в клетку происходит ее связывание с рибонуклеазным ингибитором [17].

Возможными мишенями для РНКазы А могут быть циркулирующие в плазме крови РНК, включая pre-miРНК и miРНК, участвующие в регуляции онкогенеза и инвазии [3, 36, 37]. Известно, что в злокачественных опухолях различного происхождения экспрессия большинства miРНК, участвующих в регуляции опухолеспецифичных генов, нарушена [38, 39]. Так, показано, что повышение экспрессии miR-9 в случае рака молочной железы приводит к снижению уровня E-кадгерина и усилению инвазии [40]. Было показано, что в плазме больных плоскоклеточным раком языка повышен уровень miR-184, которые оказывают стимулирующее влияние на антиапоптотические и пролиферативные свойства опухолевых клеток [41]. Мишенью для ДНКазы I могут быть внеклеточные опухолеспецифические ДНК, которые, согласно геном-генометастатической теории, способны трансфецировать клетки удаленных от первичной опухоли органов, приводя к развитию метастазов [4].

Известно, что некоторые пептиды небольшого размера в чрезвычайно невысоких концентрациях способны оказывать противоопухолевый эффект [42] и иммуностимулирующее действие [43, 44], однако механизм их действия еще до конца не выяснен. Нельзя исключить, что обнаружен-

ное в нашей работе антиметастатическое действие РНКазы А и ДНКазы I, наблюдаемое в диапазоне низких доз, может быть связано с образованием биогенных пептидов в результате протеолиза ферментов в кровотоке.

Исчезновение противоопухолевой активности РНКазы А при повышении дозы свыше 0.5 мг/кг и при долговременном введении фермента (наблюдаемое нами снижение противоопухолевого эффекта на 13-й день развития опухоли) может быть связано с образованием специфических антител против РНКазы А. Подтверждением этому являются признаки антигенной стимуляции иммунной системы, наблюдаемые после введения РНКазы А: увеличение содержания лимфоцитов в мозговом слое тимуса и селезенке, инверсия слоев тимуса и инфильтрация метастатических очагов мононуклеарами.

## ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований мы показали, что внутримышечное введение РНКазы А и ДНКазы I оказывает системный эффект на злокачественные опухоли, который выражается в замедлении роста опухоли (РНКазы А), в снижении количества и площади метастазов и в деструктивных изменениях очагов метастазирования (оба фермента). При этом дозы ферментов, при которых наблюдается наибольшая антиметастатическая активность, не оказывают токсического действия на организм животных. Полученные данные позволяют предложить применение РНКазы А и ДНКазы I в качестве терапии сопроводения для лечения метастазирующих форм опухолей. ●

*Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 09-04-01362), Программами Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки – медицине», Программой государственной поддержки молодых российских ученых и ведущих научных школ (гранты Президента РФ МК-309.2008.4 и НШ-3689.2008.4).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dalmay T., Edwards D.R. // *Oncogene*. 2006. V. 25. № 46. P. 6170–6175.
- Ardelt B., Ardel W., Darzynkiewicz Z. // *Cell Cycle*. 2003. V. 2. № 1. P. 22–24.
- Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G. et al. // *Cancer Res*. 2005. V. 65. № 16. P. 7065–7070.
- Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D.C., Ontanon J. et al. // *Blood*. 2000. V. 95. № 2. P. 724–735.
- Kotchetkov R., Cinatl J., Krivtchik A.A. et al. // *Anticancer Res*. 2001. V. 21. P. 1035–1042.
- Soucek J., Pouckova P., Matousek J. et al. // *Neoplasma*. 1996. V. 43. № 5. P. 335–340.
- Cinatl J., Cinatl J., Kotchetkov R. et al. // *Int. J. Oncol*. 1999. V. 15. № 5. P. 1001–1009.
- Pouckova P., Zadinova M., Hlouskova D. et al. // *J. Control Release*. 2004. V. 95. № 1. P. 83–92.
- Rybak S.M., Pearson J.W., Fogler W.E. et al. // *J. Natl. Cancer Inst*. 1996. V. 88. № 11. P. 747–753.
- Lee I., Lee Y.H., Mikulski S.M. // *J. Surg. Oncol*. 2000. V. 73. № 3. P. 164–171.
- Costanzi J., Sidranski D., Navon A. et al. // *Cancer Invest*. 2005. V. 23. № 7. P. 643–650.
- Ledoux L. // *Nature*. 1955. V. 175. № 4449. P. 258–259.
- Ledoux L. // *Nature*. 1955. V. 176. № 4470. P. 36–37.
- De Lamirande G. // *Nature*. 1961. V. 192. P. 52–54.
- Roth J.S. // *Cancer Res*. 1963. V. 23. P. 657–666.
- Klink T.A., Raines R.T. // *J. Biol. Chem*. 2000. V. 275. P. 17463–17467.
- Leland P.A., Schultz L.W., Kim B.M., Raines R.T. // *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 10407–10412.
- Rutkoski T.J., Raines R.T. // *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2008. V. 9. № 3. P. 185–189.
- Wu Y., Mikulski S.M., Ardel W. et al. // *J. Biol. Chem*. 1993. V. 268. № 14. P. 10686–10693.
- Kim J.S., Soucek J., Matousek J., Raines R.T. // *J. Biol. Chem*. 1995. V. 270. № 18. P. 10525–10530.
- Sugihara S., Yamamoto T., Tanaka H. et al. // *Br. J. Cancer*. 1993. V. 67. P. 66–70.
- Tokita K., Sugihara S., Hiraoka T. et al. // *Invasion Metastasis*. 1995. V. 15. P. 46–59.

- Silberklang M., Gillum A.M., RhajBhandary // *Methods Enzymol*. 1979. V. 59. P. 58–109.
- Tomayko M.M., Reynolds C.P. // *Cancer Chemother. Pharmacol*. 1989. V. 24. P. 148–154.
- Klink T.A., Raines R.T. // *Biol. Chem*. 2000. V. 275. P. 17463–17467.
- Kim J.S., Soucek J., Matousek J. et al. // *J. Biol. Chem*. 1995. V. 270. P. 31097–31102.
- Matousek J. // *Comp. Biochem. Physiol. C*. 2001. V. 129. P. 175–191.
- Haigis M.C., Raines R.T. // *J. Cell Sci*. 2003. V. 116. P. 313–324.
- Zhao H., Ardel B., Ardel W. et al. // *Cell Cycle*. 2008. V. 7. P. 3258–3261.
- Sorrentino S., Naddeo M., Russo A. et al. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 10182–10190.
- Blaszczak J., Gan J., Tropea J.E. et al. // *Structure*. 2004. V. 12. P. 457–466.
- Kojima K. // *Nagoya J. Med. Sci*. 1993. V. 56. P. 1–18.
- Ran S., Downes A., Thorpe P.E. // *Cancer Res*. 2002. V. 62. P. 6132–6140.
- Ilinskaya O.N., Dreyer F., Mitkevich V.A. et al. // *Protein Sci*. 2002. V. 11. P. 2522–2525.
- Ilinskaya O.N., Koschinski A., Mitkevich V.A. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004. V. 314. P. 550–554.
- Zhang B., Pan X., Cobb G.P. et al. // *Dev. Biol*. 2007. V. 302. P. 1–12.
- Wong T.S., Liu X.B., Wong B.Y. et al. // *Clin. Cancer Res*. 2008. V. 14. P. 2588–2592.
- Garzon R., Fabbri M., Cimmino A. et al. // *Trends Mol. Med*. 2006. V. 12. № 12. P. 580–587.
- Zhang B., Pan X., Cobb G.P. et al. // *Dev. Biol*. 2007. V. 302. № 1. P. 1–12.
- Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G. et al. // *Cancer Res*. 2005. V. 65. № 16. P. 7065–7070.
- Wong T.S., Liu X.B., Wong B.Y. et al. // *Clin. Cancer Res*. 2008. V. 14. № 9. P. 2588–2592.
- Fauve R.M. // In: Azuma I., Jollès G. (ed) *Immunostimulants: Now and Tomorrow*. 1987. Springer-Verlag, Berlin. P.225–234.
- Januaz M., Wiczorek Z., Spiegel K. et al. // *Mol. Immunol*. 1987. V. 249. № 10. P. 1029–1031.
- Vanhooft G., Goossens F., De Meester I. et al. // *The FASEB Journal*. 1995. V. 9. P. 736–744.



УДК 577.151.7, 608.2

# Эффективное и стереоселективное ацилирование 1-фенилэтиламина в водной среде без активации ацильного донора, катализируемое пенициллинацилазой

Д.Ф. Гуранда, Г.А. Ушаков, В.К. Швядас\*

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, 1, стр. 73

\*E-mail: vyfas@belozersky.msu.ru

**РЕФЕРАТ** До недавнего времени биокаталитические методы получения энантиомеров первичных аминов были основаны исключительно на стереоселективном ацильном переносе в органической среде при использовании активированных ацильных доноров. На примере реакции конденсации фенилуксусной кислоты и рацемата  $\alpha$ -фенилэтиламина, катализируемой пенициллинацилазой, впервые показана возможность проведения эффективного и энантиоселективного ферментативного ацилирования амина в водной среде без использования активированных ацильных доноров. Прямая конденсация кислоты и амина протекает в мягких условиях с высокой начальной скоростью (3.3 ммоль/(л·ч)), степенью конверсии (80 % по активному энантиомеру амина) и энантиоселективностью (энантиомерный избыток продукта более 95 %). Описанный подход лишен недостатков реакций в безводных средах и представляет практическую ценность для биокаталитического получения энантиомерно чистых соединений в мягких условиях из доступных реагентов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** стереоселективное ферментативное ацилирование в водной среде, прямая конденсация, энантиомерно чистые соединения, пенициллинацилаза.

## ВВЕДЕНИЕ

Благодаря таким уникальным каталитическим свойствам ферментов, как хемо-, регио- и стереоспецифичность, биокаталитические процессы приобретают существенные преимущества по сравнению с процессами традиционного органического синтеза. Особенно ярко достоинства ферментных технологий проявляются при получении полифункциональных и энантиомерно чистых соединений. Главным образом с внедрением биокаталитических технологий эксперты связывают дальнейшее развитие мирового рынка энантиомерно чистых соединений [1], среднегодовой прирост которого в последнее десятилетие составил более 13 % [2]. Особый интерес представляют методы получения энантиомерно чистых аминов, являющихся важными хиральными синтонами для фармацевтической промышленности и агрохимии [3].

На данный момент большинство биокаталитических промышленных процессов основано на реакциях гидролиза амидов и сложных эфиров, хотя реакции синтеза зачастую представляют больший практический интерес [4]. Сложившаяся ситуация обусловлена тем, что в водной среде, наиболее благоприятной для масштабных биокаталитических процессов, равновесие реакции смещено в сторону гидролиза. Для смещения равновесия в сторону образования амидной и эфирной связи в литературе были предложены

подходы, связанные с проведением реакций в среде органических растворителей [5]. Долгое время ферментативные превращения в органических средах казались наиболее перспективными для проведения реакций синтеза [6–9]. По этой причине основное внимание было направлено на использование ферментов, стабильных в органических растворителях. Вплоть до недавнего времени возможность ферментативного ацилирования аминов была показана лишь в безводных органических средах при использовании липаз как катализаторов ацильного переноса на амины от активированных ацильных доноров [10–12]. Хотя применение липаз можно считать весьма успешным, использование биокатализа в безводных средах осложнено рядом обстоятельств, среди которых следует отметить низкую активность ферментов [13], а также необходимость в сокращении использования экологически опасных органических растворителей, которые вносят основной вклад в образование отходов фармацевтической промышленности [14].

Критический анализ исследований в области стереоселективных биокаталитических трансформаций свидетельствует о том, что при надлежащей оптимизации ферментативные реакции синтеза с использованием воды в качестве растворителя могут быть значительно эффективнее, чем представлялось ранее. Одним из показательных примеров является высокоэффективное и стереоселективное ацили-

рование аминов методом активированного ацильного переноса, катализируемого пенициллинацилазой в 100 %-ной водной среде [15]. Этот пример стал возможным благодаря уникальным каталитическим свойствам фермента пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis* [16], а именно его высокой каталитической активности и стабильности в щелочной среде (рН около 10), представляющей собой оптимальные условия ацилирования высокоосновных аминов.

В данном сообщении представлены первые результаты по эффективному и стереоселективному ферментативному ацилированию аминов в водной среде методом прямой конденсации амина и карбоновой кислоты, используемой в качестве ацильного донора. Практический интерес к разработке эффективного метода разделения энантиомеров  $\alpha$ -фенилэтиламина обусловлен их использованием в качестве вспомогательных хиральных реагентов при получении энантиомеров различных классов химических соединений [17, 18].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реагенты.** В работе использовали фенилацетилхлорид (Sigma, США); фенилуксусную кислоту (Aldrich Chemie, ФРГ); (*R*)- и (*S*)- $\alpha$ -фенилэтиламин (Fluka, Швейцария); фенилметилсульфонилфторид, додецилсульфат натрия (Merck, ФРГ); ацетонитрил («Криохром», Россия); *N*-фенилацетильные производные  $\alpha$ -фенилэтиламина синтезированы, как описано ранее [15]; препарат ПА из *Alcaligenes faecalis* был предоставлен компанией ООО «Инновации и высокие технологии МГУ» (Россия). Концентрацию активных центров пенициллинацилазы определяли согласно [16].

**ВЭЖХ анализ.** Концентрацию компонентов реакционной смеси, а также энантиомерную чистоту продукта синтеза, *N*-фенилацетил-(*R*)- $\alpha$ -фенилэтиламина, определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии при использовании хроматографической системы Perkin Elmer Series 200 (Perkin Elmer, США), как описано ранее [15].

**Ферментативную реакцию прямой конденсации фенилуксусной кислоты и ( $\pm$ )- $\alpha$ -фенилэтиламина** проводили из эквимольной смеси реагентов (0.2 М) при перемешивании в термостатируемой ячейке рН-стата (Titrimo 718, Metrohm, Швейцария) при рН 7.5, 15 °С; концентрация пенициллинацилазы составляла 12 мкМ. Продукт синтеза, *N*-фенилацетил-(*R*)-фенилэтиламин, выпадал в осадок по ходу реакции. Аликвоты (50  $\mu$ l) гетерогенной реакционной среды добавляли к 1.95 мл подвижной фазы для полного растворения компонентов, а также остановки реакции и после разбавления элюентом подвергали традиционному и хиральному ВЭЖХ анализу. Ферментативную реакцию проводили до достижения равновесия, пока концентрации компонентов в системе не достигали практически постоянных значений. Затем реакционную смесь отфильтровывали через стеклянный фильтр, продукт синтеза промывали водой, перекристаллизовывали из водного этанола и высушивали в эксикаторе над хлоридом кальция. Выход 0.145 г, (38 %); е.е. 95 %; температура плавления 117–118 °С; <sup>1</sup>H ЯМР (250 МГц, CDCl<sub>3</sub>): 1.29 (д, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.47 (с, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.01 (м, 1H, CH), 5.49 (д, 1H, NH), 7.04–7.29 (м, 10H, Ph). MS *m/z*: 239 (M), 120 (PhCH<sub>2</sub>CH(NH)CH<sub>3</sub>), 105 (PhCCH<sub>3</sub>), 91 (PhCH<sub>2</sub>), 77 (Ph), 65.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стереоселективное ацилирование является важнейшей стадией разделения рацематов аминов, и применение ферментов как катализаторов этого процесса представляется весьма перспективным. Следует отметить, однако, что первичные амины являются высокоосновными соединениями, и условия их эффективного ацилирования могут быть достигнуты лишь в щелочной водной среде (рН около 10) или в безводной органической среде, где большинство ферментов малоактивны и нестабильны. Наряду с этим при проведении ферментативных реакций в органических растворителях приходится использовать активированные ацильные доноры, которые способны спонтанно и нестереоизбирательно ацилировать реакционноспособные аминогруппы, что снижает энантиомерную чистоту продукта [3, 9]. Вышеперечисленные недостатки, как нам представляется, можно обойти при проведении ферментативных реакций ацилирования аминов в водной среде методом прямой конденсации карбоновой кислоты и амина. В данном случае благоприятные с термодинамической точки зрения условия протекания конденсации достигаются практически в нейтральной реакционной среде (при рН 6–8), где большинство ферментов являются высокоактивными и стабильными. В этих условиях оба исходных субстрата хорошо растворимы и стабильны, что позволяет создать высококонцентрированные растворы компонентов и обеспечить выгодные термодинамические условия для ферментативного ацилирования амина. Движущей силой реакции, обеспечивающей высокую производительность процесса, является смещение равновесия в сторону синтеза за счет выпадения в осадок малорастворимого в воде целевого продукта. Следует отметить, что при проведении прямой конденсации не требуется активация ацильного донора, что упрощает и удешевляет процесс ферментативного ацилирования амина. Широкая субстратная специфичность и стереоселективность пенициллинацилаз по отношению к *N*-ацилированным производным аминокислот [16, 19, 20] дает надежду на то, что ферментативное ацилирование аминов методом прямой конденсации с использованием ферментов этого семейства может быть эффективным.

Действительно, уже первые опыты показали, что конденсация фенилуксусной кислоты и рацемата  $\alpha$ -фенилэтиламина, катализируемая пенициллинацилазой в водной среде, протекает весьма эффективно, начальная скорость составляет 3.3 ммоль/(л·ч). Буквально через несколько минут после начала реакции целевой продукт синтеза (*N*-фенилацетил-(*R*)-фенилэтиламин) начинает выпадать в осадок. Синтез протекает достаточно быстро вплоть до достижения степени превращения 30–35 % от исходных концентраций реагентов (рис. 1, А). Затем реакция конденсации замедляется, что, по-видимому, обусловлено достижением состояния термодинамического равновесия. Об этом свидетельствует контрольный эксперимент, показавший, что к этому моменту инактивации фермента не наблюдается и пенициллинацилаза практически полностью сохраняет свою каталитическую активность.

Анализ энантиомерной чистоты целевого продукта на разных степенях конверсии показал (рис. 1, Б) высокую стереоселективность ацилирования. Энантиомерный избыток целевого продукта составил 98 и 96 % при степени конверсии 30 и 40 %, соответственно. По завершении реак-

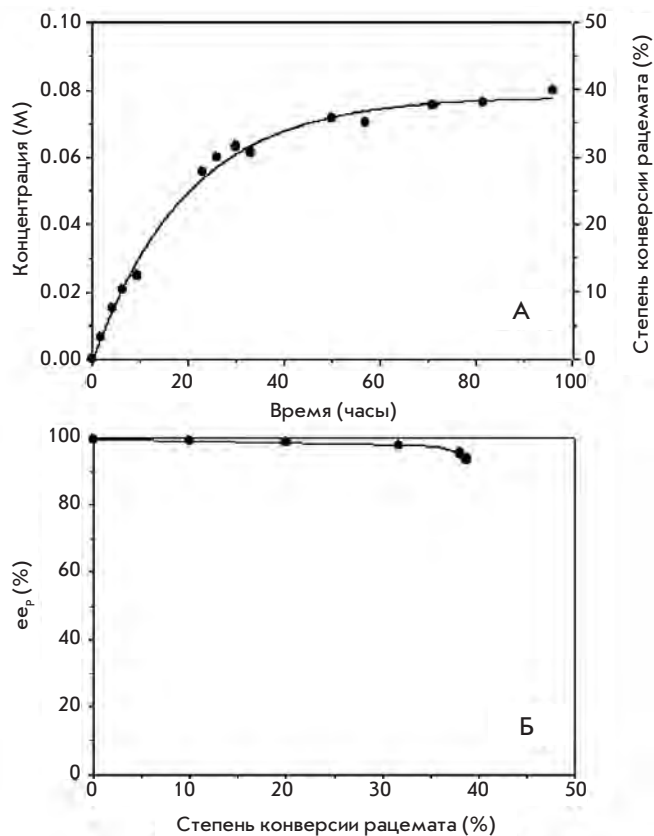


Рис. 1. Синтез энантимерно чистого N-фенилацетил-(R)-фенилэтиламина методом стереоселективной прямой конденсации фенилуксусной кислоты и рацемата ( $\pm$ )- $\alpha$ -фенилэтиламина в водной среде, катализируемой пенициллинацилазой из *Alcaligenes faecalis*: (A) – интегральная кинетика образования продукта синтеза, (B) – энантимерный избыток целевого продукта при разных степенях конверсии. Условия описаны в экспериментальной части

ции целевой продукт, N-фенилацетил-(R)-фенилэтиламин, в виде осадка легко выделяется из реакционной смеси. Выход N-фенилацетил-(R)-фенилэтиламина по активному энантиомеру амина составил 80 %, энантимерный избыток был равен 95 %.

Описанный метод ацилирования амина лишен недостатков ферментативных реакций, проводимых в среде органических растворителей, и представляет практическую ценность для биокаталитического получения энантимерно чистых соединений в мягких условиях из доступных реагентов. Для выяснения перспектив препаративного использования данного метода необходимо его сравнение с методом ферментативного ацилирования аминов в водной среде с использованием активированных ацильных доноров, предложенных ранее [15]. Каждый подход имеет свои сильные и слабые стороны. При использовании активированных ацильных доноров достигается высокая скорость и глубина ацилирования, а также энантиомерная чистота целевого продукта. Однако при этом необходимо использовать более дорогостоящие ацильные доноры и проводить процесс в щелочной среде, где фермент является менее стабильным. Принципиальным достоинством метода прямой конденсации является возможность использования дешевых ацильных

доноров и проведения реакции в более мягких условиях, где большинство ферментов, в т.ч. и все представители семейства пенициллинацилаз, являются более активными и стабильными. Эти аргументы могут стать решающими в пользу применения метода прямой конденсации при препаративном разделении рацематов широкого круга аминов.

Представленные результаты являются лишь первым наблюдением, и условия проведения ферментативного ацилирования аминов путем прямой конденсации нуждаются в оптимизации. Можно ожидать, что стереоселективное ацилирование аминокислот методом прямой конденсации станет важной составной частью интегрального биокаталитического метода получения энантиомеров аминокислот [21]. В дальнейшем предполагается детально исследовать влияние различных факторов на положение равновесия, а также кинетические закономерности реакций стереоселективного ацилирования различных аминов методом прямой конденсации, катализируемого пенициллинацилазой в водной среде.

### ВЫВОДЫ

Впервые показана возможность проведения эффективного и энантиоселективного ферментативного ацилирования первичных аминов в водной среде без использования активированных ацильных доноров. Прямая конденсация под действием пенициллинацилазы протекает эффективно, целевой продукт высокой энантиомерной чистоты легко выделяется из реакционной смеси с хорошим выходом. Разработанный подход может быть использован для препаративного биокаталитического получения энантимерно чистых аминов в мягких условиях при использовании доступных субстратов и биокатализатора. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 07-08-00696).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Moorecroft M. Biocatalysis shines for chiral manufacture. Frost & Sullivan Market Insight. 2003; <http://chemicals.frost.com/prod/servlet/market-insight-top.pag?docid=4056760&ctxLink=FcmCtx7&ctxLabel=FcmCtx8>
- Understanding chiral technologies. Pharma-reports. 2008; [http://www.reportbuyer.com/pharma\\_healthcare/research\\_r\\_d/understanding\\_chiral\\_technologies.html](http://www.reportbuyer.com/pharma_healthcare/research_r_d/understanding_chiral_technologies.html)
- Van Rantwijk F, Sheldon R.A. // Tetrahedron. 2004. V. 60. P. 501–519.
- Methods in Biotechnology. Walker J.M., Series Editor. 15. Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols, edited by Vulfson E.N., Halling P.J. and Holland H.L., Humana Press Inc. 2001. 679 p.
- Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J., Hydrolases in Organic Synthesis. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006.
- Klibanov A.M. // Nature. 2001. V. 409. P. 241–246.
- Lee M.-Y., Dordick J.S. // Current Opinion Biotechnol. 2002. 13. P. 376–384.
- Carrea G., Riva S. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2000. 39(13). P. 2226–2254.
- Schmid A., Dordick J.S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B. // Nature. 2001. V. 409. P. 258–268.
- Jaeger K.-E., Liebeton K., Zonta A., Schimossek K., Reetz M.T. // Appl. Microb. Technol. 1996. V. 46. P. 99–105.
- Takayama S., Lee S.T., Hung S.C., Wong C.H. // Chem. Commun. 1999. P. 127–128.
- Iglesias L.E., Rebollo F., Gotor V. // Tetrahedron: Asymmetry. 2000. V. 11. P. 1047–1050.
- Klibanov A.M. // Trends Biotechnol. 1997. V. 15. P. 97–101.
- Carey J.S., Laffan D., Thomson C., Williams M.T. // Org. Biomol. Chem. 2006. V. 4. P. 2337–2347.
- Guranda D.T., Van Langen L.M., Van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. // Tetrahedron: Asymmetry. 2001. V. 12. P. 1645–1650.
- Švedas V., Guranda D., Van Langen L., Van Rantwijk F., Sheldon R. // FEBS Lett. 1997. V. 417. № 3. P. 414–418.
- Juaristi E., Escalante J., Leon-Romo J.L. and Reyes A. // Tetrahedron: Asymmetry. 1998. V. 9. P. 715–740.
- Juaristi E., Leon-Romo J.L., Reyes A. and Escalante J. // Tetrahedron: Asymmetry. 1999. V. 10. P. 2441–2495.
- Švedas V.K., Savchenko M.V., Beltser A.I., Guranda D.F. // Ann. N.-Y. Acad. Sci. 1996. V. 799. P. 659–669.
- Galunsky B., Lummer K., Kasche V. // Monatsh. Chem. 2000. V. 131. P. 623–632.
- Guranda D.T., Khimiuk A.I., Van Langen L.M., Van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. // Tetrahedron: Asymmetry. 2004. V. 15. P. 2901–2906.



УДК 577.1:577.15

# Инактивация пероксидом водорода как метод оценки стрессовой стабильности формиаатдегидрогеназы *in vivo*

С.С. Савин<sup>1,2</sup>, В.И. Тишков<sup>1,2,3\*</sup><sup>1</sup> Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33<sup>2</sup> ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва, Цимлянская ул., 16, оф. 96<sup>3</sup> Химический факультет МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

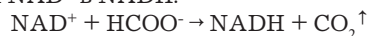
\*E-mail: vitishkov@gmail.com

**РЕФЕРАТ** Исследование кинетики инактивации пероксидом водорода мутантной формиаатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH) с заменой Cys255Ala свидетельствует, что взаимодействие фермента с инактивирующим агентом протекает по простому бимолекулярному механизму. В присутствии избытка пероксида водорода потеря активности описывается кинетикой реакции первого порядка. Поэтому наблюдаемая эффективная константа скорости инактивации первого порядка, полученная для различных форм ФДГ при постоянной концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, может быть использована в качестве количественной характеристики стабильности этих форм. Показано, что два остатка цистеина, расположенные в формиаат- и кофермент-связывающем доменах активного центра (Cys145 и Cys255 соответственно), при инактивации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вносят одинаковый вклад в стабильность фермента, а остаток Cys354 не является существенным. Сравнение кинетики инактивации PseFDH дикого типа, мутанта PseFDH Cys145Ser/Cys255Ala и стресс-индуцируемых формиаатдегидрогеназ из бактерий *Staphylococcus aureus*, растений *Arabidopsis thaliana* и сои *Glycine max* свидетельствует, что «стрессовые» ФДГ минимум в 20 раз более стабильны против инактивации пероксидом водорода, чем PseFDH, экспрессия которой индуцируется при росте бактерий *Pseudomonas* sp. 101 на метаноле, но не в условиях стрессовых воздействий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** формиаатдегидрогеназа, пероксид водорода, инактивация, стресс, мутантный фермент.

## ВВЕДЕНИЕ

Формиаатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, ФДГ) является NAD<sup>+</sup>-зависимым ферментом. Она катализирует окисление формиаат-иона до углекислого газа при сопряженном восстановлении NAD<sup>+</sup> в NADH.



Эта реакция является одной из важнейших, поскольку обеспечивает клетку NADH, который потом идет на синтез аденозинтрифосфата. ФДГ широко распространены в природе. Они найдены в различных типах бактерий, например метилотрофных бактериях, симбиотических азотфиксирующих бактериях [1]. Кроме того, гены ФДГ обнаружены в большом количестве патогенных микроорганизмов – как в бактериях (*Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* str. k10, различных штаммах *Bordetella* и *Legionella pneumophila*, *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4), так и в микроскопических грибах (*Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* JEC21 и др.) [1]. Формиаатдегидрогеназы также были найдены в различных типах дрожжей, непатогенных микроскопических грибах, мхах и растениях. В патогенных микроорганизмах и растениях эти ферменты являются белками стресса. При стрессовых воздействиях содержание ФДГ в этих организмах возрастает в десятки раз [2].

Формиаатдегидрогеназа представляет большой интерес не только в плане изучения ее физиологической роли,

но и с точки зрения исследования механизма действия этого фермента. ФДГ принадлежит к суперсемейству D-специфичных дегидрогеназ 2-гидроксиацетат [3]. Субстрат формиаатдегидрогеназы – формиаат-ион, является одним из самых простых по структуре среди субстратов для других ферментов данного суперсемейства. Кроме того, в каталитическом цикле ФДГ отсутствуют стадии кислотно-основного катализа. Именно поэтому формиаатдегидрогеназа рассматривается как модельный фермент для всего суперсемейства D-специфичных дегидрогеназ 2-гидроксиацетат.

На практике формиаатдегидрогеназа широко используется в тонком органическом синтезе. Этот фермент является идеальным биокатализатором для регенерации кофакторов. На основе системы регенерации NAD(P)H с помощью ФДГ было разработано большое число процессов синтеза оптически активных соединений [4–7]. В качестве примера можно привести процесс получения *tert*-L-лейцина, который реализован в объеме сотен тонн в год фирмой Degussa (новое название Evonik) [8]. Поэтому разработка новых биокатализаторов на основе ФДГ, которая будет стабильна не только в водных растворах, но и в более агрессивных средах, является важной задачей сегодняшнего дня.

Если рассматривать стабильность ФДГ, то можно выделить три основных воздействия на фермент, по которым она оценивается. Во-первых, это температурная ста-

бильность – способность фермента сохранять активность при повышенных температурах. Как правило, термоинактивация ферментов связана с денатурацией белковой глобулы. Формиатдегидрогеназы из разных источников сильно отличаются по своей термостабильности. Например, ФДГ из сои, которая была клонирована в нашей лаборатории, быстро инактивируется уже при температуре порядка 45–46 °С [9]. То же самое касается и ФДГ из пекарских дрожжей. В то же время клонированные в нашей лаборатории ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 и *Staphylococcus aureus* и из растений *Arabidopsis thaliana* показывают высокую стабильность при температурах 60–65 °С.

Второй важной характеристикой фермента является т.н. химическая стабильность – способность сохранять активность в присутствии химических реагентов, модифицирующих аминокислотные остатки белка. Как правило, это остатки, расположенные в активном центре фермента или отвечающие за поддержание третичной и четвертичной структуры. В случае формиатдегидрогеназ наиболее критичными являются остатки цистеина. Практически все ФДГ имеют существенные остатки цистеина. Большинство случаев инактивации фермента при температурах до 40 °С связаны с тем, что происходит либо химическая модификация, либо окисление сульфогидрильных групп.

Третий тип стабильности связан со стабильностью в присутствии протеаз. Этот тип стабильности очень важен при хранении белков. Даже незначительные примеси протеаз (сотые и даже тысячные доли процента) могут привести к полной потере активности при хранении. Систематических исследований ФДГ в этой области не проводилось, однако ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 не расщепляется протеазами *E.coli* при культивировании штамма-продуцента рекомбинантного фермента в течение 72 и более часов.

Если процессы изучения термостабильности ФДГ хорошо изучены и описаны в литературе, то в случае с химической стабильностью таких экспериментов намного меньше. Фактически, такие эксперименты были сделаны только на нескольких ферментах, таких как ФДГ бактерий *Pseudomonas* sp.101 [10, 11], *Mycobacterium vaccae* N10 [12] и дрожжей *Candida boidinii* [13]. При проведении подобных экспериментов важным моментом является способ, с помощью которого можно будет охарактеризовать химическую стабильность фермента. В случае ФДГ для инактивации применяли ионы ртути  $Hg^{2+}$ , меди  $Cu^{2+}$ , специфические реагенты на сульфгидрильные группы остатков цистеина, такие как 5,5'-дитиобис(2-нитробензоат) (ДТНБ) и *n*-хлормеркурибензоат. Однако получить четкую корреляцию между данными по химической стабильности и структурой модифицирующего агента так и не удалось.

В нашей работе мы решили использовать другой реагент – пероксид водорода.  $H_2O_2$  был выбран в качестве инактивирующего агента по следующим причинам:

1. Пероксид водорода имеет небольшие размеры и способен окислять сульфгидрильные группы не только на поверхности, но и в глубине белковой глобулы. Широко используемые реагенты для модификации остатков цистеина, такие как *n*-хлормеркурибензоат и ДТНБ, имеют достаточно большие размеры и в силу стерических затруднений в первую очередь быстро взаимодействуют

с высокореакционноспособным остатком Cys255, а скорость взаимодействия с остальным(и), неиндефицированным(и) остатком(ми) Cys в несколько десятков раз медленнее [10].

2. Пероксид водорода активно образуется в природе, т.е. он является *природным* инактивирующим агентом. В силу природного происхождения и малого размера молекулы пероксид водорода является хорошим химическим агентом для оценки стабильности ФДГ *in vivo*.

3. Высокие концентрации пероксида водорода в клетке возникают при стрессовых воздействиях. В ряде случаев в условиях стресса в клетке также резко возрастает концентрация ФДГ. Например, в растениях формиатдегидрогеназа локализована в митохондриях, и в стрессовых ситуациях содержание фермента внутри органеллы возрастает до 9 % от общего белка митохондрий [14]. ФДГ из патогенного микроорганизма *Staphylococcus aureus* также является белком стресса. При росте *S.aureus* в виде биопленок количество мРНК ФДГ в клетке занимает третье место среди всех мРНК. В этих условиях уровень биосинтеза ФДГ возрастает в 20 раз по сравнению с таковым при росте бактерий в виде планктона [15]. Таким образом, можно полагать, что ФДГ, индукция биосинтеза которых происходит в условиях стресса, должны проявлять более высокую стабильность в присутствии пероксида водорода по сравнению с формиатдегидрогеназами, которые синтезируются в клетке не при стрессовых воздействиях, например, как ФДГ из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp.101 при росте на метаноле.

Целью данной работы было сравнить стабильности ФДГ дикого типа из разных источников при инактивации под действием пероксида водорода, а также изучить роль отдельных остатков Cys в химической стабильности ФДГ из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp.101. Для решения поставленной задачи были запланированы следующие эксперименты:

1) изучить кинетику инактивации модельного фермента в присутствии различных концентраций пероксида водорода и определить возможный кинетический механизм;

2) исследовать роль отдельных остатков цистеина в ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101, а именно остатков Cys в положениях 145 (формиат-связывающий участок активного центра, расположен в глубине активного центра), 255 (кофермент-связывающий участок активного центра, экспонирован в раствор) и 354 (расположен вдали от активного центра, экспонирован в раствор);

3) сравнить химическую стабильность ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (синтез фермента в нестрессовых условиях) и бактерий *S. aureus* и растений *A. thaliana* и сои *G max* (повышенный синтез фермента при стрессовых воздействиях).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Препараты рекомбинантной формиатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH) и ее мутантные формы с точечной заменой Cys255Ala и двойными заменами Cys-145Ser/Cys255Ala и Cys255Ala/Cys354Ser, а также рекомбинантные ФДГ дикого типа из бактерий *S. aureus* (SauFDH) и растений *A. thaliana* (AraFDH) и сои *G max* (SoyFDH) были любезно предоставлены ООО «Инновации и высокие технологии МГУ» (<http://www.innotech-msu.com>). Соглас-

но данным аналитического электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия все препараты были не менее 97–98 %-ной степени чистоты.

**Определение активности формилдегидрогеназ.** Активность ФДГ определяли спектрофотометрически по накоплению NADH при длине волны 340 нм ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) на спектрофотометре Shimadzu UV 1601PC при 30 °C в 0.1M натрий-фосфатном буфере, pH 7.0. Концентрации  $\text{NAD}^+$  и формиата натрия в кювете были насыщающими и составляли 1.5 мМ и 0.3M соответственно.

**Исследование инактивации рекомбинантных ФДГ пероксидом водорода.** Инактивацию ФДГ пероксидом водорода изучали в 0.1M натрий-фосфатном буфере, 0.01M ЭДТА, pH 7.0, при 25 °C. Концентрацию  $\text{H}_2\text{O}_2$  определяли по поглощению на 240 нм, пользуясь коэффициентом экстинкции, равным  $43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Для эксперимента брали раствор ФДГ с активностью 2.5–4 единицы на миллилитр и добавляли к нему раствор пероксида водорода нужной концентрации в соотношении 0.7 объема раствора фермента и 0.3 объема раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ , предварительно термостатированных при 25 °C. Раствор быстро перемешивали и помещали в предварительно прогретый до температуры 25 °C термостат «Гном» (точность термостатирования  $\pm 0.1$  °C). Затем в определенные моменты отбирали пробы по 20 мкл для измерения остаточной активности. Для приготовления рабочих растворов пероксида водорода брали раствор с концентрацией 33 % (9.1 моль) и разбавляли бидистиллированной водой до нужной концентрации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### ИНАКТИВАЦИЯ PSEFDH С ЗАМЕНОЙ CYS255ALA ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

Для изучения зависимости скорости инактивации ФДГ от концентрации пероксида водорода была выбрана мутантная форма фермента из *Pseudomonas* sp.101 серии GAV. Как уже отмечалось выше, в активном центре PseFDH имеется два остатка Cys в положениях 145 и 255. Химическая модификация любого из них может привести к инактивации фермента. Существовала вероятность того, что, как и в случае химической модификации ДТНБ, пероксид водорода может по-разному взаимодействовать с этими остатками – остаток Cys145 расположен в глубине активного центра, а второй остаток – Cys255 находится на поверхности белковой глобулы и доступен действию растворителя. Поскольку в первую очередь было интересно изучить инактивацию PseFDH пероксидом водорода именно за счет окисления остатка Cys145, поэтому в этой серии экспериментов была использована мутантная PseFDH, у которой остаток Cys255 был заменен на остаток аланина (PseFDH Cys255Ala).

Зависимости остаточной активности фермента от времени при всех изученных концентрациях пероксида водорода описываются простой экспонентой. В полулогарифмических координатах эти зависимости представляют собой серию прямых (рис. 1). Из тангенса угла наклона прямой можно рассчитать эффективную константу скорости инактивации  $k_{in}^{эф}$ . Величина этой константы не зависела от концентрации фермента.

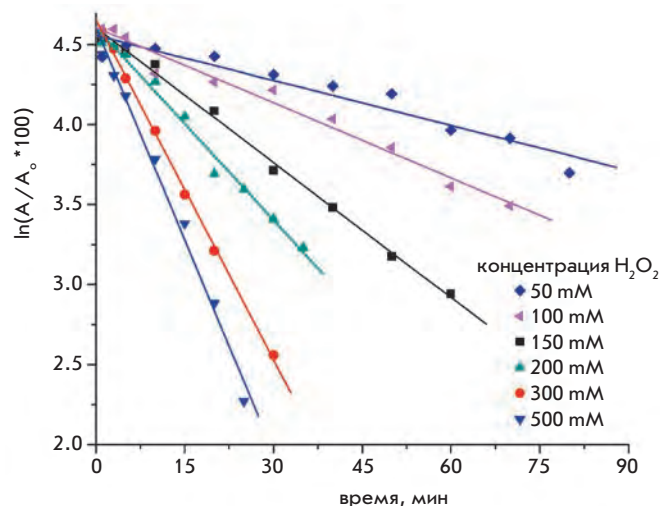
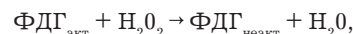


Рис. 1. Инактивация PseFDH с заменой Cys255Ala в присутствии различных концентраций пероксида водорода. 0.1M фосфатный буфер, pH 7.0, 25 °C

Если предположить, что взаимодействие фермента с пероксидом водорода происходит по би-молекулярному механизму:



то скорость реакции инактивации будет описываться уравнением

$$v_{in} = k_{in} * [\text{ФДГ}_{\text{акт}}] * [\text{H}_2\text{O}_2],$$

где  $[\text{ФДГ}_{\text{акт}}]$  и  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  – концентрации активного фермента и пероксида водорода в данный момент времени. Если учесть, что  $[\text{H}_2\text{O}_2] \gg [\text{ФДГ}_{\text{акт}}]_0$ , то расходом пероксида водорода в ходе реакции можно пренебречь (т.е.  $[\text{H}_2\text{O}_2] \approx [\text{H}_2\text{O}_2]_0$ ). В этом случае для процесса инактивации фермента должны наблюдаться первый порядок реакции, а эффективная константа скорости инактивации первого порядка будет равна

$$k_{in}^{эф} = k_{in} * [\text{H}_2\text{O}_2]_0.$$

Истинная константа скорости инактивации второго порядка может быть определена из зависимости эффективной константы скорости инактивации  $k_{in}^{эф}$  от концентрации пероксида водорода. Как видно из рис. 2, наблюдаемая зависимость  $k_{in}^{эф}$  от концентрации пероксида действительно представляет собой прямую. Величина бимолекулярной константы скорости инактивации PseFDH с заменой Cys255Ala составила  $(3.17 \pm 0.14) * 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ .

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что инактивация фермента происходит в результате бимолекулярной реакции, когда фермент сразу взаимодействует с пероксидом водорода без образования промежуточного комплекса. Поскольку в присутствии избытка пероксида водорода инактивация протекает в соответствии с кинетикой реакции первого порядка, то величина наблюдаемой эффективной константы скорости инактивации первого порядка  $k_{in}^{эф}$  не должна зависеть от концентрации фермента (что и наблюдали в реальных экспериментах). Поэтому, если инактивацию формилдегидрогеназ из разных источников (или различных мутантных форм) изучать



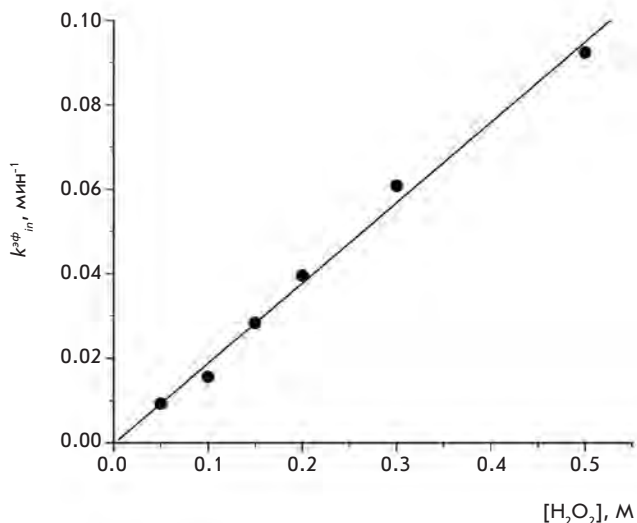


Рис. 2. Зависимость эффективной константы скорости инактивации  $k_{in}^{эф}$  PseFDH с заменой Cys255Ala от концентрации пероксида водорода. 0.1M фосфатный буфер, pH 7.0, 25 °C

при одной и той же постоянной концентрации пероксида водорода, то величина эффективной константы скорости инактивации первого порядка  $k_{in}^{эф}$  может быть использована в качестве количественной характеристики стабильности данной ФДГ. В дальнейшем для проведения экспериментов была выбрана концентрация пероксида водорода 0.15M.

### ИНАКТИВАЦИЯ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА МУТАНТНЫХ ФОРМ PSEFDH

На рис. 3 представлены результаты изучения инактивации пероксидом водорода фермента дикого типа и трех мутантных форм ФДГ из *Pseudomonas* sp.101, в которых были заменены различные остатки цистеина. Ранее нами были получены многочисленные мутантные формы PseFDH с различными заменами остатков Cys в положениях 145, 255 и 354, однако в данной работе были изучены только те мутанты, которые имели наилучшие кинетические свойства.

Инактивация пероксидом водорода всех мутантных форм PseFDH и фермента дикого типа описывается кинетикой реакции первого порядка. Как и следовало ожидать, самая низкая стабильность наблюдается в случае фермента дикого типа (рис. 3, нижняя прямая). Замена остатка Cys255 на остаток Ala приводит к тому, что константа скорости инактивации снижается в два раза ( $k_{in}^{эф}$   $9.13 \times 10^{-4}$  и  $4.69 \times 10^{-4}$  c<sup>-1</sup> соответственно). В следующей мутантной форме PseFDH в дополнение к замене Cys255Ala была введена мутация Cys354Ser. Как видно, замена остатка цистеина 354 на остаток серина очень слабо влияет на стабильность фермента против инактивации пероксидом водорода, что подтверждает наши данные о том, что этот остаток цистеина не является существенным для проявления каталитической активности фермента [1]. Наиболее высокая стабильность против инактивации пероксидом

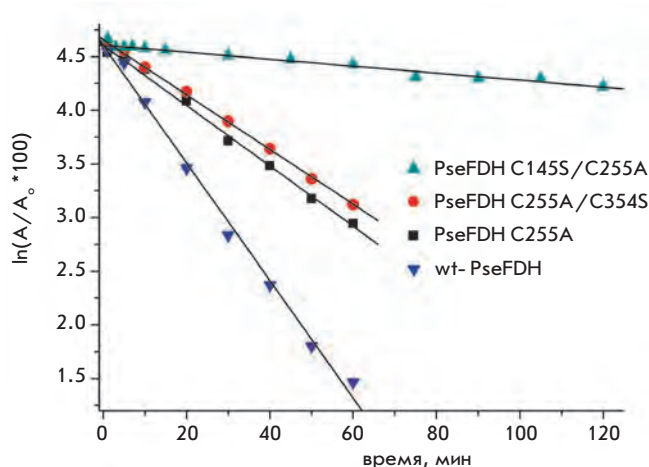


Рис. 3. Инактивация пероксидом водорода PseFDH дикого типа (wt- PseFDH) и ее мутантов с различными заменами остатков Cys. 0.15M пероксид водорода, 0.1M фосфатный буфер, pH 7.0, 25 °C

водорода наблюдается в случае замены двух остатков цистеина, расположенных в активном центре фермента, – Cys145Ser и Cys255Ala.

Сравнение величин эффективных констант скоростей инактивации  $k_{in}^{эф}$  для PseFDH дикого типа и ее мутантов PseFDH Cys255Ala и PseFDH Cys145Ser/Cys255Ala (табл. 1) позволяет оценить вклад каждого из этих остатков в стабильность фермента. В случае остатка Cys255 вклад в величину  $k_{in}^{эф}$  составляет  $4.40 \times 10^{-5}$  c<sup>-1</sup> (разность между  $k_{in}^{эф}$  для PseFDH дикого типа и PseFDH Cys255Ala). Для остатка Cys145 вклад в величину  $k_{in}^{эф}$  составляет  $4.17 \times 10^{-5}$  c<sup>-1</sup> (разность между  $k_{in}^{эф}$  для PseFDH Cys255Ala и PseFDH Cys145Ser/Cys255Ala), т.е. оба остатка практически одинаково взаимодействуют с пероксидом водорода, несмотря на то что один остаток расположен на поверхности, а второй – в глубине белковой глобулы. Как отмечалось выше, в случае использования в качестве модифицирующего агента ДТНБ разница в реакционной способности между остатками Cys145 и Cys255 составляла минимум 2–3 порядка [10].

### ИНАКТИВАЦИЯ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗ ИЗ БАКТЕРИЙ И РАСТЕНИЙ

На последнем этапе мы изучили устойчивость против инактивации пероксидом водорода ФДГ из разных источников. Для исследования были взяты 3 формиаатде-

Таблица 1. Эффективные константы скорости инактивации пероксидом водорода PseFDH дикого типа и ее мутантов (0.15M пероксид водорода, 0.1 M фосфат, pH 7.0)

Фермент	PseFDH дикого типа	PseFDH C255A	PseFDH C255A/C354S	PseFDH C145S/C255A
$k_{in}^{эф} \times 10^{-5}, c^{-1}$	91.3 ± 3.2	46.9 ± 1.2	42.5 ± 0.8	5.20 ± 0.37

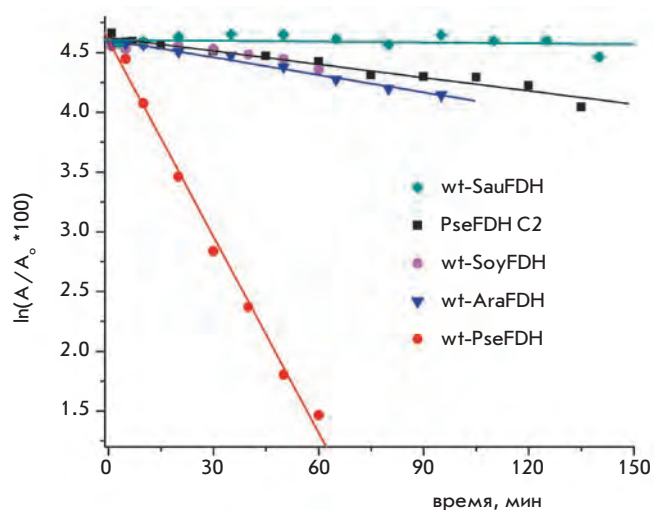


Рис. 4. Инактивации пероксидом водорода ФДГ из различных источников. wt-SauFDH, wt-PseFDH, wt-SoyFDH и wt-AraFDH – рекомбинантные формиаатдегидрогеназы дикого типа из бактерий *S.aureus* и *Pseudomonas* sp.101, сои *Glycine max* и растений *A.thaliana* соответственно. PseFDH C2 – мутантная PseFDH C145S/C255A. 0.15M пероксид водорода, 0.1M фосфатный буфер, pH 7.0, 25 °C

гидрогеназы, чей биосинтез резко возрастает в условиях стресса (бактериальная SauFDH и растительные AraFDH и SoyFDH) (рис. 4). В качестве сравнения использовали ФДГ из *Pseudomonas* sp.101 дикого типа и ее наиболее устойчивый против инактивации пероксидом водорода мутант PseFDH Cys145Ser/Cys255Ala. PseFDH не является белком стресса. Ее биосинтез индуцируется при росте бактерий *Pseudomonas* sp.101 на метаноле. Как видно из рис. 4, «стрессовые» ФДГ, как растительные, так и бактериальная, обладают высокой стабильностью против инактивации пероксидом водорода. Они намного стабильнее, чем PseFDH дикого типа, и только самый лучший мутант PseFDH Cys145Ser/Cys255Ala может сравниться по стабильности с формиаатдегидрогеназами растений. Также отметим, что растительные ФДГ, демонстрируя практически одинаковую стабильность против инактивации пероксидом водорода, отличаются по термостабильности более чем в 5000 раз [9]. Самой высокой стабильностью при инактивации пероксидом водорода обладала ФДГ из патогенных бактерий *S.aureus*. Из рис. 4 видно, что после 4 ч инкубации в присутствии 0.15M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> активность этого фермента составляла более 90 % от исходной. SauFDH также характеризуется высокой термостабильностью. По этому параметру среди известных формиаатдегидрогеназ она уступает только PseFDH.

Эксперименты по инактивации пероксидом водорода растительных формиаатдегидрогеназ дикого типа и бактериальных SauFDH дикого типа и двойного мутанта PseFDH Cys145Ser/Cys255Ala свидетельствуют, что даже в отсутствие остатков цистеина в активном центре все вышеуказанные ферменты, пусть гораздо медленнее, но все равно теряют активность (рис. 4). Значения эффективных констант скорости инактивации для точечного мутанта PseFDH Cys255Ala и двойного мутанта Cys255Ala/Cys-

354Ser (табл. 1) свидетельствуют, что это падение активности, скорее всего, связано не с окислением остатков Cys, расположенных вне активного центра фермента, а с модификацией каких-то других аминокислотных остатков, т.е. пероксид водорода не является специфическим реагентом на остатки Cys в ФДГ, и именно эта неспецифичность действия позволяет с помощью H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> выявить наличие в молекуле ФДГ других аминокислотных остатков, окисление которых приводит к потере ферментативной активности, и по величине  $k^{эф}_{in}$  количественно оценить вклад этих остатков в химическую стабильность фермента. В случае растительных ФДГ вклад этих остатков в 6 раз меньше, чем для SauFDH (рис. 4).

Более высокая стабильность SauFDH при инактивации пероксидом водорода по сравнению с ФДГ растений очень хорошо согласуется с требованиями по стабильности этих ферментов при стрессовых воздействиях на организм *in vivo*. В случае растений величина и длительность таких воздействий, при которых клетка погибает, намного меньше по сравнению с теми стрессовыми условиями, при которых могут существовать биопленки *S.aureus*. Очевидно, что более высокая сопротивляемость стафилококков стрессу должна быть обеспечена высокой стабильностью всех компонентов клетки (в т.ч. и формиаатдегидрогеназы), отвечающих за выживание в стрессовых условиях. Таким образом, наши данные подтверждают высказанную во введении гипотезу, что ФДГ, синтез которых возрастает в стрессовых условиях, должны обладать высокой стабильностью против инактивации пероксидом водорода, причем эта стабильность должна быть тем выше, чем более сильным стрессовым воздействиям подвергается клетка. Таким образом, данные по инактивации очищенных препаратов ФДГ пероксидом водорода могут быть использованы для сравнительной оценки стрессовой стабильности формиаатдегидрогеназ *in vivo*. ●

Работа поддержана Российским Фондом фундаментальных исследований (грант № 08-04-01589-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biomol. Eng.* 2006. V. 23. P. 89.
2. Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Small I.D., Remy R. // *Plant Physiol.* 1993. V. 102. P. 1171.
3. Vinals C., Depiereux E., Feytmans E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. V. 192. P. 182.
4. Hummel W., Kula M.R. // *Eur. J. Biochem.* 1989. V. 184. P. 1.
5. Hummel W. // *Trends Biotechnol.* 1999. V. 17. P. 487.
6. Liese A., Filho M.V. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999. V. 10. P. 595.
7. Тишков В.И., Попов В.О. // *Биохимия.* 2004. Т. 69. С. 1537.
8. Bommarius A.S., Schwarm M., Stingl K., Kottenhahn M., Huthmacher K., Drauz K. // *Tetrahedron-Asymmetry.* 1995. V. 6. P. 2851.
9. Sadykhov E., Serov A., Voinova N., Uglanova S., Petrov A. et al. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006. V. 42. P. 236.
10. Tishkov V.I., Galkin A.G., Marchenko G.N., Egorova O.A., Sheluho D.V. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. V. 192. P. 976.
11. Odintzeva E.R., Popova A.S., Rojkova A.M., Tishkov V.I. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2002. V. 43. P. 356.
12. Yamamoto H., Mitsuhashi K., Kimoto N., Kobayashi Y., Esaki N. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004.
13. Slusarczyk H., Felber S., Kula M.R., Pohl M. // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 1280.
14. Colas des Francs-Small C., Ambard-Bretteville F., Darpas A., Sallantin M., Huet J.C. et al. // *Plant Physiol.* 1992. V. 98. P. 273.
15. Resch A., Rosenstein R., Nerz C., Gotz F. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 2663.

УДК 577.152.34

# Изменение пула протеасом в процессе злокачественной трансформации клеток печени мыши

Т.М. Астахова, Г.В. Делоне, Ю.В. Люпина, Е.Б. Абрамова, И.В. Урываева, Н.П. Шарова\*  
 Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26  
 \*E-mail: npsharova@bk.ru

**РЕФЕРАТ** Множественные формы протеасом регулируют клеточные процессы, устраняя белки или образуя пептиды, в этих процессах участвующие. Можно полагать, что различные патологии, в т.ч. злокачественная трансформация клеток, связаны с изменениями функционирования множественных форм протеасом. В настоящей работе исследованы изменения в пуле протеасом печени при регенераторной узелковой гиперплазии гепатоцитов и образовании на ее фоне аденомы и гепатоклеточной карциномы у мышей, подвергнутых действию дипина и последующей операции частичной гепатэктомии. Относительное содержание различных форм протеасом изучали с помощью Вестерн-блоттинга. Химотрипсинподобную активность протеасом оценивали по гидролизу флуорогенного коммерческого субстрата Suc-LLVY-AMC. Выявлено, что изменения в пуле протеасом начинаются уже при формировании диффузных узелков и заключаются в возрастании экспрессии конститутивной субъединицы X( $\beta$ 5) и иммунных субъединиц LMP7( $\beta$ 5i) и LMP2( $\beta$ 1i), что сопровождается увеличением тотального пула протеасом и падением его химотрипсинподобной активности. Эти изменения были более выраженными при образовании гепатоклеточной карциномы. Аденома занимала промежуточное положение между образцами печени с диффузными узелками и гепатоклеточной карциномой по изменению химотрипсинподобной активности и содержания тотального пула протеасом и субъединицы LMP2( $\beta$ 1i). Помимо этого, образование злокачественной опухоли было связано с повышением уровня субъединицы Rpt6, входящей в состав 19S-активатора протеасом. Полученные результаты дают основание полагать, что регенераторная узелковая гиперплазия печени и аденоматоз являются этапами, предшествующими образованию гепатоклеточной карциномы. Кроме того, полученные результаты ставят задачу поиска сигнальных путей, приводящих к изменению экспрессии субъединиц протеасом при злокачественной трансформации клеток. Проведенная работа указывает на перспективность использования 19S-активатора протеасом, избыточно экспрессирующегося в злокачественной опухоли, в качестве мишени для разработки новых противоопухолевых лекарств.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** иммунные протеасомы, 19S-активатор протеасом, химотрипсинподобная активность протеасом, Вестерн-блоттинг, регенераторная узелковая гиперплазия гепатоцитов, аденома, гепатоклеточная карцинома, печень мыши.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ХТП-активность, химотрипсинподобная активность; nNOS, нейрональная NO-синтаза; дипин, 1,4-бис-[N,N'-ди(Этилен)-фосфамид] пиперазин; Suc-LLVY-AMC, N-succinyl-leu-leu-val-tyr7-amido-4-methyl coumarin; MG132, Z-leucyl-leucyl-leucinal; mAb, моноклональные антитела; pAb, поликлональные антитела.

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение молекулярных механизмов злокачественной трансформации клеток по сей день остается одной из наиболее актуальных проблем. Открытие в 80-х годах прошлого века новой системы гидролиза белков, связанной с протеасомами и затрагивающей все клеточные процессы, выявило дополнительные перспективы в исследовании механизмов злокачественной трансформации клеток млекопитающих. Протеасомы, мультисубъединичные мультипротеиназные белковые комплексы, присутствуют в органах и тканях млекопитающих во множественных формах, различающихся структурой и физиологической ролью [1–4]. По набору протеолитически активных субъединиц все многообразие этих форм можно свести к двум группам – конститутивным и иммунным протеасомам. В состав конститутивных протеасом входят по две субъединицы X( $\beta$ 5),

Y( $\beta$ 1) и Z( $\beta$ 2), проявляющие, соответственно, химотрипсин-, каспаза- и трипсинподобную активности. При сборке иммунных протеасом в их структуру встраиваются иммунные субъединицы LMP7( $\beta$ 5i), LMP2( $\beta$ 1i) и LMP10( $\beta$ 2i) вместо перечисленных протеолитических субъединиц конститутивных протеасом. В процессе гидролиза чужеродных белков иммунными протеасомами образуется в несколько раз больше антигенных эпитопов, способных встраиваться в щель Бюркмана молекул главного комплекса гистосовместимости класса I для последующего их представления T-лимфоцитам. Кроме того, иммунные протеасомы участвуют в регуляции дифференцировки и пролиферации некоторых клеточных популяций, вероятно, за счет продуцирования биологически активных пептидов [5, 6] и представляют собой необходимое звено сигнального пути, гасящего окислительный стресс [7].



Как конститутивные, так и иммунные протеасомы образуют пулы 26S- и 20S-протеасом [3]. 26S-протеасомы состоят из протеолитической субчастицы 20S и одной или двух 19S-субчастиц-активаторов, осуществляющих связывание с убиквитинированными белками-мишенями, их расплетание и проталкивание в протеолитическую камеру. Таким образом, 26S-протеасомы регулируют клеточные процессы, устраняя белки или образуя пептиды, участвующие в этих процессах, и запускают реакции, связанные с Т-клеточным звеном иммунитета. Функционирование 26S-протеасом, как правило, зависит от АТФ и убиквитина. 20S-протеасомы, напротив, расщепляют белки и короткие пептиды независимо от АТФ и убиквитина. С каждым годом увеличивается список обнаруженных белков-субстратов 20S-протеасом. К ним относятся, например, белки с поврежденной третичной структурой [8], ряд вирусных белков [9, 10].

Учитывая многообразие функций протеасом, можно говорить о важности выявления изменений, происходящих в пуле протеасом при злокачественной трансформации клеток, как для понимания механизмов этого процесса, так и для поиска новых мишеней противоопухолевой терапии среди множественных форм протеасом. Немногочисленные литературные данные, связанные с этим вопросом, касаются сравнения содержания той или иной формы протеасом в злокачественных и контрольных клетках [11–16]. В то же время понимание особенностей функционирования пула протеасом на этапах образования доброкачественной и злокачественной опухолей могло бы прояснить некоторые механизмы перехода клеток в состояние злокачественности. Поэтому целью настоящей работы было выявить изменения, затрагивающие пул протеасом при образовании доброкачественных и злокачественных опухолей, на одной и той же модели животных. Для исследования была выбрана разработанная ранее модель индуцирования злокачественной трансформации клеток печени у мышей CBA/Lac x BL/6 F1 под действием алкилирующего препарата дипина и последующей операции частичной резекции печени [17, 18]. Дипин вызывает в гепатоцитах нерепарируемые повреждения генетического материала, которые после стимуляции митозов частичной резекцией печени приводят к хромосомным разрывам и перестройкам. Клетки, несущие такие повреждения, оказываются нежизнеспособными и постепенно гибнут. Восстановление паренхимы происходит за счет активации тканевого стволового резерва и клонального роста новообразованных гепатоклеточных узелков, которые, сливаясь и вытесняя исходные дегенерирующие гепатоциты, формируют новую ткань. Этот процесс узелковой регенераторной гиперплазии носит диффузный характер, но со временем единичные узелки могут прогрессировать и дать начало образованию крупных аденом и гепатокарцином. В настоящей работе проведено сравнительное исследование ХТП-активности и содержания тотального пула протеасом, а также содержания 26S- и иммунных протеасом в интактной печени и индуцированных печеночных доброкачественных и злокачественных опухолях.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы.** В работе использованы Suc-LLVY-AMC и MG132 фирмы Sigma (США), mAb мыши к β-актину

фирмы Santa Cruz (Германия), mAb мыши к субъединицам Rpt6 и α1,2,3,5,6,7, pAb кролика к субъединицам X(β5), LMP7(β5i) и LMP2(β1i) фирмы Biomol (Великобритания), pAb кролика к nNOS фирмы Abcam (Великобритания). Набор ECL, нитроцеллюлозные мембраны Hybond-ECL и антитела к IgG мыши и кролика, конъюгированные с пероксидазой, получены от фирмы Amersham Biosciences (Великобритания).

**Животные.** Исследование выполняли на мышках CBA/Lac x BL/6 F1. Группе самцов весом 20–22 г в возрасте трех месяцев вводили дипин из расчета 60 мкг на 1 г веса и проводили стандартную операцию частичной резекции печени (до 70 %) согласно разработанной ранее схеме [17]. В качестве контрольных групп животных использовали мышей с интактной печенью и мышей, подвергнутых операции частичной резекции печени. Через 12 мес. исследовали печень контрольных и опытных животных.

**Гистологическое исследование печени.** Фрагменты печени и крупных опухолевых узлов фиксировали в 10 %-ном формалине. Фиксированный материал проводили по стандартной методике, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5 мкм. После депарафинирования препараты окрашивали гематоксилин-эозином, заключали в бальзам и анализировали с помощью светового микроскопа Olym-pus АНВТЗ (Австрия).

**Получение осветленных гомогенатов фрагментов печени и опухолей.** Все процедуры проводили при 0–4 °С. Фрагменты печени и опухоли промывали стандартным фосфатным солевым буфером, обсушивали, взвешивали и гомогенизировали в гомогенизаторе (стекло-стекло) (Braun Melsungen, Германия) в буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM дитиотреитол, 10 %-ный глицерин, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM АТФ, 10 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, лейпептин (0.5 мкг/мл), пепстатин (1 мкг/мл) и апротинин (1 мкг/мл), в соотношении 1 : 3. Гомогенаты центрифугировали при 10 000g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость (осветленные гомогенаты) использовали для дальнейших исследований. Концентрацию белка в осветленных гомогенатах определяли по методу Лоури [19].

**Определение активности протеасом.** Активность протеасом определяли по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC, утилизирующегося ХТП-центрами протеасом [20]. Реакционная смесь содержала 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM дитиотреитол, 30 мкМ Suc-LLVY-AMC, 5 mM MgCl<sub>2</sub> и 1 mM АТФ. Для исключения вклада примесных протеолитических активностей в ряд проб добавляли 10 мкМ MG132, ингибитор ХТП-центров протеасом. Реакцию проводили при 37 °С в течение 20 мин после внесения 0.5–2 мкл осветленного гомогената в реакционную смесь (до 100 мкл конечного объема) и останавливали 1 %-ным Ds-Na. Образовавшийся продукт регистрировали на флуориметре при значениях возбуждающей длины волны 380 нм и эмиссии 440 нм. Окончательные расчеты проводили по разнице между полной и остаточной активностями в присутствии MG132. Активность выражали в нмоль Suc-LLVY-AMC, гидролизованного протеасомами, содержащимися в 100 мкл осветленных гомогенатов, в течение 20 мин.

**Вестерн-блоттинг.** Относительное содержание субъединиц протеасом, nNOS и β-актина в осветленных гомо-

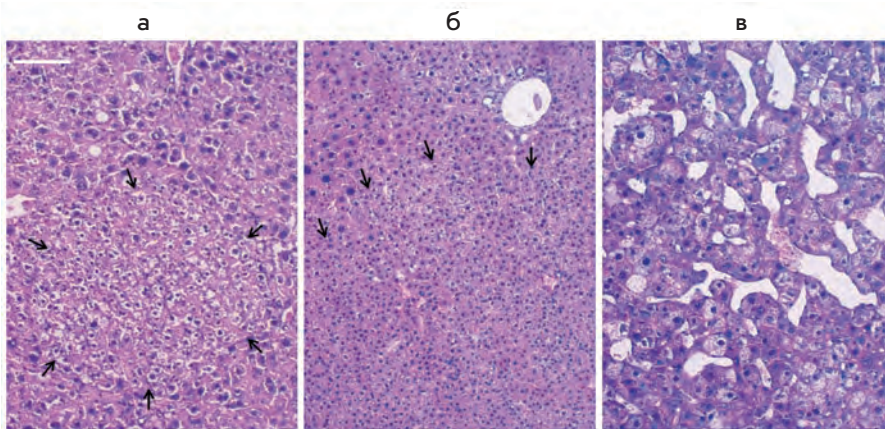


Рис. 1. Гепатоклеточные опухоли, развившиеся на фоне хронического регенеративного состояния печени через 12 мес. после воздействия дипина и частичной гепатэктомии: а – узелок-микроаденома, состоящий из мелких гепатоцитов с диплоидными ядрами; б – крупная гепатоклеточная аденома, в которой отсутствует типичная для печени структура долек и сосудистого русла; в – гепатоклеточная карцинома трабекулярного типа с цитомегалией, аномальным строением трабекул и синусоидов. Окраска гематоксилин-эозином. Стрелками указаны границы опухолей. Шкала 100 мкм

генах определяли с помощью Вестерн-блоттинга. После электрофореза белков осветленных гомогенатов (по 5 мкл на дорожку, 120–148 мкг белка) в 10–13 %-ном ПААГ в присутствии Ds-Na осуществляли полусухой перенос полипептидов из геля на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану инкубировали в течение 2 ч при 20 °С в буфере TNT (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20), затем в течение 1 ч в буфере TNT, содержащем 2–5 %-ное обезжиренное молоко и mAb мыши к β-актину (1 : 200), или субъединице Rpt6 (1 : 2500), или субъединицам α1,2,3,5,6,7 (1 : 2500) (или pAb кролика к nNOS (1 : 500), или к субъединице X(β5), или LMP7(β5i), или LMP2(β1i) в разведении 1 : 1250). Затем мембрану отмывали несколько раз буфером TNT и инкубировали в течение 1 ч в буфере TNT, содержащем 2–5 %-ное обезжиренное молоко и антитела к IgG мыши (или кролика), конъюгированные с пероксидазой, в разведении 1 : 2500. После отмывки в буфере TNT мембрану подвергали стандартной обработке системой ECL.

Для анализа изображения использовали компьютерную программу ImageJ. Относительное содержание исследуемых белков в осветленных гомогенатах определяли по плотности соответствующих полос на рентгеновской пленке. Предварительно строили графики зависимости плотности от количества белка, подвергаемого Вестерн-блоттингу. Для дальнейшей работы выбирали тот диапазон количества белка, в котором указанная зависимость носила прямолинейный характер.

**Статистический анализ.** Данные представлены как среднее ± доверительный интервал (δ):

$$\delta = \pm t\sigma n^{-0.5},$$

где *t* – коэффициент Стьюдента при уровне значимости *p* < 0.05, *σ* – стандартная ошибка, *n* – число экспериментов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Гистологическое исследование печени мышей.** На рис. 1 представлены результаты гистологического исследования печени через 12 мес. после инъекции мышам дипина и последующей операции частичной гепатэктомии. В ткани печени выявляются множественные узелки (доброкачественные новообразования, микроаденомы) (рис. 1, а), которые формируются в диффузном процессе регенераторной узелковой гиперплазии гепатоцитов. Кроме того, были об-

наружены крупные доброкачественные новообразования, аденомы (рис. 1, б) и злокачественные новообразования, соответствующие по биологическим характеристикам гепатоклеточным карциномам трабекулярного типа (рис. 1, в) [21]. В образцах опухолей и фрагментах печени с диффузной узелковой гиперплазией исследовали ХТП-активность тотального пула протеасом и содержание различных субъединиц протеасом в сравнении с таковыми в печени контрольных животных.

**Технические замечания по исследованию изменений в пуле протеасом при образовании опухолей.** Относительное содержание тотального пула протеасом в образцах исследовали Вестерн-блоттингом с применением антител к субъединицам α1,2,3,5,6,7, входящим в состав всех форм протеасом. Аналогично определяли относительное содержание 26S-протеасом с использованием антител к субъединице Rpt6, входящей в состав 19S-субчастицы 26S-протеасом, и относительное содержание протеолитических субъединиц X(β5), LMP7(β5i) и LMP2(β1i) протеасом с использованием антител к этим субъединицам.

Наряду с исследованием содержания субъединиц протеасом в осветленных гомогенатах печени и индуцированных опухолей было проанализировано содержание тотального белка и β-актина, обычно используемых для стандартизации активности и количества изучаемых белков в различных тканях. Содержание тотального белка в осветленном гомогенате гепатоклеточной карциномы было незначительно, но достоверно снижено по сравнению с таковым в осветленном гомогенате интактной печени (табл. 1). В то же время содержание β-актина было существенно выше в образце гепатоклеточной карциномы (рис. 2, табл. 1). Поэтому в настоящем исследовании оба эти показателя непригодны к использованию в качестве внутреннего контроля для стандартизации характеристик исследуемых белков. Более корректным представляется сравнение активности и содержания субъединиц протеасом в печени контрольных мышей и печеночных опухолях из расчета на стандартизированный вес сырой ткани.

Следует отметить, что в качестве дополнительного контроля использовали печень, регенерировавшую после операции частичной резекции и не подвергнутую действию дипина. Осветленные гомогенаты ткани этой печени не от-

личались от осветленных гомогенатов интактной печени по ХТП-активности протеасом и уровню всех исследованных субъединиц протеасом,  $\beta$ -актина и тотального белка (данные не приведены).

**Сходство и отличие в изменении пула протеасом при образовании доброкачественных и злокачественной опухолей.** Изменения в пуле протеасом начинаются уже при образовании диффузных узелков и выражаются в увеличении тотального пула протеасом и возрастании экспрессии конститутивной субъединицы X( $\beta$ 5) и иммунных субъединиц LMP7( $\beta$ 5i) и LMP2( $\beta$ 1i) (рис. 2, табл. 1). По степени увеличения экспрессии эти субъединицы встраиваются в ряд: LMP2( $\beta$ 1i) > LMP7( $\beta$ 5i) > X( $\beta$ 5). Причем по возрастанию содержания субъединицы LMP2( $\beta$ 1i) можно судить и о возрастании содержания третьей иммунной субъединицы LMP10( $\beta$ 2i), поскольку они встраиваются в протеасомы совместно, в то время как иммунная субъединица LMP7( $\beta$ 5i) способна включаться в протеасомы независимо от двух других иммунных субъединиц [22, 23]. Повышение уровня исследованных субъединиц в общем пуле протеасом сопровождалось снижением его активности по отношению к олигопептиду Suc-LLVY-АМС, утилизирующемуся ХТП-центрами конститутивной субъединицы X( $\beta$ 5) и иммунной субъединицы LMP7( $\beta$ 5i) (табл. 1).

Образование злокачественной опухоли было связано с еще более сильным падением ХТП-активности протеасом и еще более выраженным увеличением тотального пула протеасом и содержания иммунных субъединиц и конститутивной субъединицы X( $\beta$ 5) (рис. 2, табл. 1). Однако характер возрастания уровня этих субъединиц был иным: LMP2( $\beta$ 1i) > X( $\beta$ 5) > LMP7( $\beta$ 5i). Следует отметить, что, хотя содержание иммунной субъединицы LMP7( $\beta$ 5i) в гепатоклеточной карциноме превышало таковое в контрольной ткани печени и фрагментах печени с диффузными узелками, однако оно не отличалось от содержания этой субъединицы в аденоме. В свою очередь, аденома занимала промежуточное положение между образцами пе-

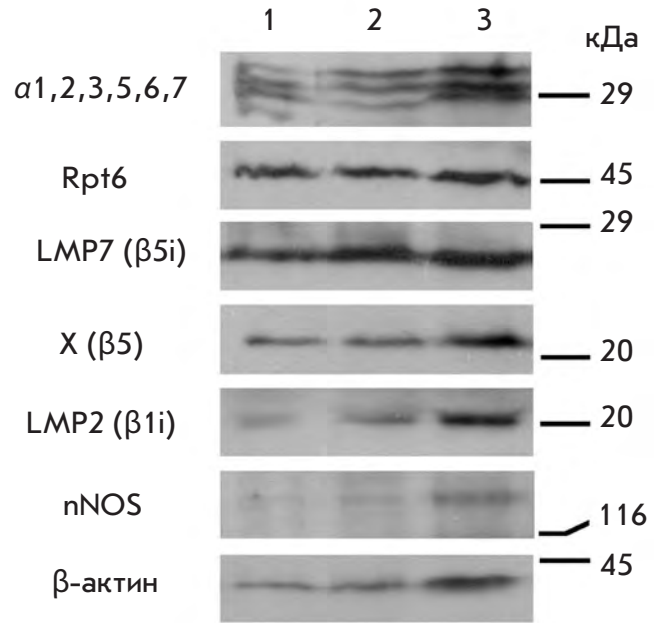


Рис. 2. Вестерн-блоты белков осветленных гомогенатов интактной печени (1), печени с диффузными узелками (2) и гепатоклеточной карциномы (3) с использованием антител к субъединицам  $\alpha$ 1,2,3,5,6,7, Rpt6, LMP7( $\beta$ 5i), X( $\beta$ 5), LMP2( $\beta$ 1i) протеасом, nNOS и  $\beta$ -актину. Маркеры: карбоангидраза (29 кДа), овальбумин (45 кДа), ингибитор трипсина (20 кДа) и  $\beta$ -галактозидаза (116 кДа)

чени с диффузными узелками и гепатоклеточной карциномой по содержанию тотального пула протеасом, иммунной субъединицы LMP2( $\beta$ 1i) и ХТП-активности (рис. 2, табл. 1). Эти результаты позволяют говорить о том, что при образовании доброкачественных и злокачественной опухолей тотальный пул протеасом увеличивается за счет множественных форм иммунных протеасом, нарабатывающихся

Таблица 1. ХТП-активность протеасом и содержание субъединиц протеасом, nNOS,  $\beta$ -актина и тотального белка в осветленных гомогенатах печени и индуцированных печеночных опухолей у мышей

Параметр	Значение параметра в осветленном гомогенате				
	интактной печени	печени с узелковой гиперплазией гепатоцитов	аденомы	гепатоклеточной карциномы	
ХТП-активность протеасом в 100 мкл образца (нмоль Suc-LLVY-АМС)	18.6 ± 1.3	13.7 ± 0.5	11.2 ± 0.5	5.3 ± 0.3	
Содержание субъединиц протеасом (%)	$\alpha$ 1,2,3,5,6,7	100 ± 4	135 ± 3	147 ± 2	220 ± 6
	Rpt6	100 ± 3	98 ± 3	101 ± 5	150 ± 6
	X( $\beta$ 5)	100 ± 3	125 ± 5	–	210 ± 8
	LMP7( $\beta$ 5i)	100 ± 5	150 ± 4	170 ± 5	169 ± 7
	LMP2( $\beta$ 1i)	100 ± 3	200 ± 7	290 ± 17	400 ± 15
Содержание nNOS (%)	слабо выявл.	100 ± 3	–	450 ± 13	
Содержание $\beta$ -актина (%)	100 ± 2	102 ± 3	97 ± 8	270 ± 7	
Концентрация белка (мг/мл)	29.5 ± 0.9	26.5 ± 1.1	26.0 ± 0.7	24.0 ± 0.8	

За 100 % принято содержание (оптическая плотность полос) субъединиц протеасом и  $\beta$ -актина в осветленном гомогенате интактной печени, nNOS – в осветленном гомогенате печени с узелковой гиперплазией гепатоцитов. Результаты представлены как среднее ±  $\delta$ . Для каждой точки  $p < 0.05$ ,  $n \geq 5$ .



в разных соотношениях. К их числу относятся протеасомы, содержащие все три иммунные субъединицы LMP7( $\beta 5i$ ), LMP2( $\beta 1i$ ) и LMP10( $\beta 2i$ ), протеасомы, содержащие иммунную субъединицу LMP7( $\beta 5i$ ) и конститутивные субъединицы Y( $\beta 1$ ) и Z( $\beta 2$ ), а также протеасомы, содержащие конститутивную субъединицу X( $\beta 5$ ) и иммунные субъединицы LMP2( $\beta 1i$ ) и LMP10( $\beta 2i$ ).

Падение ХТП-активности при образовании опухолей нельзя объяснить исключительно изменением соотношения субъединиц X( $\beta 5$ ) и LMP7( $\beta 5i$ ), проявляющих эту активность, поскольку не наблюдается корреляции между данными величинами (табл. 1). Вероятно, более существенное влияние на ХТП-активность оказывает встраивание в протеасомы субъединицы LMP2( $\beta 1i$ ) и/или действие внутриклеточных регуляторов.

В настоящей работе выявлено принципиальное отличие пула протеасом злокачественной опухоли от пулов протеасом доброкачественных опухолей. Из всех исследованных опухолей только гепатоклеточная карцинома содержала повышенное количество 19S-активатора, входящего в состав и определяющего уровень 26S-протеасом (рис. 2, табл. 1). Возрастание уровня 26S-протеасом в гепатоклеточной карциноме вполне объяснимо. Злокачественные опухоли, в т.ч. опухоли печени, характеризуются усиленным обменом белка [24, 25], который требует, в свою очередь, увеличенного содержания протеолитических ферментов, в частности 26S-протеасом.

Вместе с тем причина возрастания уровня иммунных протеасом в гепатоклеточной карциноме не столь очевидна. С одной стороны, правомочно полагать, что иммунные протеасомы нарабатываются в трансформирующихся клетках для выявления и уничтожения этих клеток иммунной системой. Вполне возможно, что в исследуемой нами модели нефункциональны какие-то иные звенья, необходимые для развития иммунной реакции. Поэтому сколько бы ни нарабатывалось иммунных протеасом в опухолевых клетках, иммунная система не способна их уничтожить. Изучение этого вопроса входит в наши дальнейшие задачи. С другой стороны, учитывая антиоксидативную функцию иммунных протеасом, можно полагать, что путем их дополнительной наработки опухолевые клетки защищаются от действия метаболитов и иных факторов, приводящих к развитию окислительного стресса и апоптозу.

**Возможный механизм регуляции содержания иммунных протеасом в опухолях.** Отметим, что NO-зависимый сигнальный путь, направленный на «гашение» окислительного стресса в эндотелиальных клетках, связан с дополнительной экспрессией иммунной субъединицы LMP2( $\beta 1i$ ) в большей степени, чем иммунной субъединицы LMP7( $\beta 5i$ ) [7]. Эти данные совпадают с полученными нами результатами по динамике экспрессии иммунных субъединиц при образовании опухолей печени (табл. 1). Антиоксидативная функция иммунных протеасом в эндотелиальных клетках заключается в устранении рецептора трансферрина и бло-

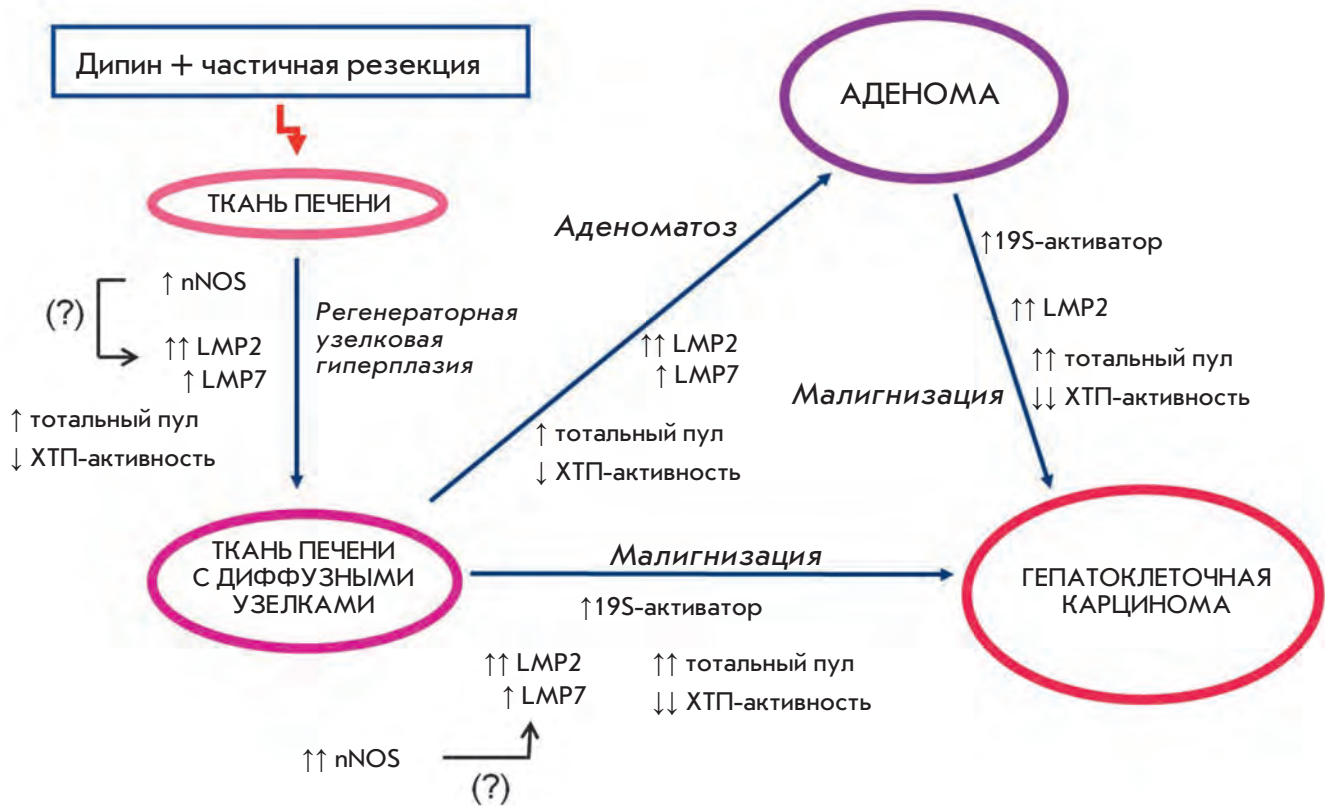


Рис. 3. Схема злокачественной трансформации клеток печени, основанная на изменениях в пуле протеасом

кировании развития цепных реакций свободнорадикального окисления с участием двухвалентного железа [7]. Вместе с тем убедительно показано, что NO играет роль антиоксиданта и в злокачественных клетках [26–28]. Не исключено, что в гепатоклеточной карциноме иммунные протеасомы также включены в NO-зависимый сигнальный путь, защищающий опухоль от окислительного стресса. В пользу этого предположения свидетельствуют полученные нами данные по увеличению экспрессии nNOS в гепатоклеточной карциноме (рис. 2, табл. 1). В то же время nNOS слабо выявлялась в печени контрольных мышей. Этот результат совпадает с литературными данными, указывающими на то, что содержание nNOS в печени взрослых мышей резко падает по сравнению с содержанием этого фермента в фетальной печени, где он регулирует гематопоз [29].

Итак, в настоящей работе показано, что образование опухолей печени у мышей связано с существенными изменениями в пуле протеасом. Причем эти изменения при узелковой гиперплазии гепатоцитов и аденоматозе выражены в меньшей степени по сравнению с изменениями при формировании гепатоклеточной карциномы, что позволяет предположить, что узелковая гиперплазия и аденоматоз являются этапами, предшествующими образованию злокачественной опухоли. На рис. 3 представлена схема злокачественной трансформации клеток печени, основанная на анализе полученных результатов.

Проведенная работа ставит новые задачи поиска сигнальных путей, приводящих к изменению экспрессии различных субъединиц протеасом при образовании опухолей. Кроме того, полученные результаты указывают на перспективность использования 19S-активатора протеасом, избыточно экспрессирующегося в злокачественных новообразованиях, в качестве мишени для разработки новых противоопухолевых лекарств. Следует отметить, что в настоящее время используется первое противоопухолевое лекарство, bortezomib (Velcade), действующее на протеасомы [30]. Bortezomib вводится в кровотоки пациентов и применяется в комплексе с другими противоопухолевыми средствами. Являясь производным бороната, bortezomib конкурентно ингибирует ХТП-активность всех форм протеасом

и временно индуцирует апоптоз, преимущественно неопластических клеток. Длительное ингибирование активности протеасом приводит к «включению» механизмов обратной связи и образованию новых протеасом [31], что объясняет временный терапевтический эффект лекарства. Вместе с тем, действуя на тотальный пул протеасом всех органов, bortezomib вызывает побочные эффекты: утомляемость, слабость, желудочно-кишечные нарушения, периферическую нейропатию и существенное ухудшение общего состояния пациентов [30]. В этой связи подавление функций 19S-активатора при сохранении протеолитической активности протеасом представляется более эффективным и безопасным способом противоопухолевой терапии.

## ВЫВОДЫ

Регенераторная узелковая гиперплазия гепатоцитов, аденоматоз и образование гепатоклеточной карциномы сопровождаются изменениями в пуле протеасом, характеризующимися как сходством, так и отличием. Сходство заключается в увеличении содержания иммунных протеасом, тотального пула протеасом и падении ХТП-активности протеасом во всех опухолях по сравнению с контролем. Отличие касается 19S-активатора протеасом, уровень которого повышается только в гепатоклеточной карциноме.

Динамика изменений в пулах протеасом печени с регенераторной узелковой гиперплазией гепатоцитов, аденомы и гепатоклеточной карциномы указывает на то, что регенераторная узелковая гиперплазия гепатоцитов и аденоматоз могут быть стадиями, предшествующими злокачественной трансформации клеток печени.

19S-активатор протеасом, избыточно экспрессирующийся только в злокачественно трансформированных клетках печени, представляется перспективной мишенью для разработки новых противоопухолевых лекарств. ●

*Авторы выражают благодарность В.С. Гореловой за помощь в работе.*

*Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК 02.512.12.2047) и РФФИ (грант № 09-04-00077).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rock K.L., Goldberg A.L. // Annu. Rev. Immunol. 1999. V. 17. P. 739–779.
2. Шарова Н.П. // Онтогенез. 2006. Т. 37. С. 171–178.
3. Sharova N., Zakharova L. // Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery. 2008. V. 2. P. 152–161.
4. Tanaka K. // Proc. Jpn. Acad., Ser. B. 2009. V. 85. P. 12–36.
5. Caudill C.M., Jayarapu K., Elenich L., et al. // J. Immunol. 2006. V. 176. P. 4075–4082.
6. Singh S., Awasthi N., Egwuagu C., Wagner B.J. // Arch. Biochem. Biophys. 2002. V. 405. P. 147–153.
7. Kotamraju S., Matalon S., Matsunaga T., et al. // Free Rad. Biol. Med. 2006. V. 40. P. 1034–1044.
8. Grune T., Reinheckel T., Davies K.J.A. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 15504–15509.
9. Voigt A., Salzmann U., Seifert U., et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 355. P. 549–554.
10. Yuksek K., Chen W.L., Chien D., Ou J.H. // J. Virol. 2009. V. 83. P. 612–621.
11. Meidenbauer N., Zippelius A., Pittet M.J., et al. // Cancer Res. 2004. V. 64. P. 6319–6326.
12. Gobbi G., Mirandola P., Micheloni C., et al. // Int. J. Oncol. 2004. V. 25. P. 1625–1629.
13. Chen L., Madura K. // Cancer Res. 2005. V. 65. P. 5599–5606.
14. Barnes C.J., Li F., Talukder A.H., Kumar R. // Clin. Cancer Res. 2005. V. 11. P. 2868–2874.
15. Mehling M., Simon P., Mittelbronn M., et al. // Acta Neuropathol. 2007. V. 114. P. 111–119.
16. Deng S., Zhou H., Xiong R., et al. // Breast Cancer Res. Treat. 2007. V. 104. P. 21–30.
17. Uryvaeva I.V. // Monogr. Dev. Biol. 1992. V. 23. P. 230–236.
18. Урываева И.В. // Биол. эксперим. биологии и медицины. 1997. Т. 124. С. 364–368.
19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
20. Ben-Shahar S., Komlosch A., Nadav E., et al. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 21963–21972.
21. Becker F.F. // Cancer Res. 1982. V. 42. P. 3918–3923.
22. Groettrup M., Stander S., Stohwasser R., Kloetzel P.-M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 8970–8975.
23. Griffin T.A., Nandi D., Cruz M., et al. // J. Exp. Med. 1998. V. 187. P. 97–104.
24. Бульдьева Т.В., Базарнова (Астахова) Т.М., Кузьмина С.Н., Збарский И.Б. // Эксперим. онкология. 1984. Т. 6. С. 35–38.
25. Bazaranova (Astakhova) T.M., Buldyeva T.V., Filatova L.S., Akopov S.B., and Zbarsky I.B. // Cell Res. 1998. V. 8. P. 195–207.
26. Juckett M.B., Weber M., Balla J. // Free Rad. Biol. Med. 1996. V. 20. P. 63–73.
27. Gorbunov N.V., Yalovich J.C., Gaddam A., et al. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 12328–12341.
28. Кондакова И.В., Загребельная Г.В. // Биомедицинская химия. 2004. Т. 50. С. 571–581.
29. Krasnov P., Michurina T., Packer M.A., et al. // Mol. Med. 2008. V. 14. P. 141–149.
30. Field-Smith A., Morgan G.J., Davies F.E. // Ther. Clin. Risk Manag. 2006. V. 2. P. 21–279.
31. Naujokat C., Fuchs D., Berges C. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1773. P. 1389–1397.

УДК 579.61

# Новые 5-модифицированные пиримидиновые нуклеозиды – ингибиторы роста микобактерий

Л.А. Александрова<sup>1\*</sup>, Э.Р. Шмаленюк<sup>1</sup>, С.Н. Кочетков<sup>1</sup>, В.В. Ерохин<sup>2</sup>, Т.Г. Смирнова<sup>2</sup>, С.Н. Андреевская<sup>2</sup>, Л.Н. Черноусова<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, 107564, Москва, Яузская аллея, 2

\*E-mail: ala2004\_07@mail.ru

**РЕФЕРАТ** Туберкулез (ТБ) является одной из важнейших проблем современного здравоохранения. В связи с появлением новых штаммов *M.tuberculosis*, на которые стандартные методы лечения практически не действуют, необходим поиск принципиально новых анти-ТБ агентов. Настоящая работа посвящена изучению способности новых аналогов пиримидиновых нуклеозидов ингибировать рост *M.tuberculosis*. Показано, что 2'-дезоксидеокси-, 3'-азидо-2',3'-дидезокси- и 3'-амино-2',3'-дидезокси- производные уридина и цитидина, содержащиеся в 5-м положении основания протяженные метилоксиалкильные заместители, способны ингибировать рост культуры микобактерий *M.tuberculosis* H37Rv *in vitro*. 5-метилоксидодецил-2'-дезоксидеоксиуридин продемонстрировал наиболее значительную анти-ТБ активность. В то же время 5'-монофосфаты изученных нуклеозидов не обладали противомикробными свойствами. Наиболее эффективные производные нуклеозидов могут послужить прототипами для создания новых противотуберкулезных препаратов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, противотуберкулезные препараты, нуклеозиды, 5-замещенные пиримидиновые нуклеозиды, ингибиторы.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ТБ – туберкулез, ВИЧ – вирус иммунодефицита человека, МЛУ – множественная лекарственная устойчивость, МИК – минимальная ингибирующая концентрация, КОЕ – колониеобразующая единица.

## ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез (ТБ) представляется одной из важнейших проблем современного здравоохранения. В начале XXI в. ТБ – одно из наиболее распространенных инфекционных заболеваний, около трети мировой популяции (более двух миллиардов человек) инфицированы *Mycobacterium tuberculosis*. По данным ВОЗ, около 9 млн человек болеет ежегодно, более 2 млн человек в год умирает от ТБ; из них 10 % инфицированы ВИЧ [1, 2]. Заражение ВИЧ повышает шанс реактивации латентной формы туберкулеза [3], и в то же время вызывает быстрое развитие ТБ вскоре после (ре)инфицирования [4]. Риск перехода латентной формы туберкулеза в активную для больных СПИДом достигает 50 %, а для остального населения – всего 10 %.

В начале 1950-х годов были разработаны эффективные и доступные методы лечения ТБ, основанные на использовании различных комбинаций лекарств. Иногда в схему химиотерапии может входить более десяти противотуберкулезных препаратов [5]. С этого времени широкое применение противотуберкулезных препаратов и вакцинация привели к значительному снижению смертности от ТБ. С другой стороны, использование лекарственных средств способствовало отбору штаммов, устойчивых одновремен-

но к препаратам нескольких классов. Больные СПИДом, наркоманы и пациенты, перенесшие трансплантацию, имеют крайне ослабленный иммунитет, и поэтому становятся жертвами ТБ. Все это привело к тому, что в конце 1980-х годов частота случаев ТБ в мире снова стала расти. В 1993 г. ВОЗ объявила в связи с ТБ о глобальной критической ситуации. Особо следует отметить новые штаммы *Mycobacterium tuberculosis*: с широкой лекарственной устойчивостью (ХДР) и множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [1], на которые стандартные схемы химиотерапии практически не действуют. МЛУ-ТБ обычно возникает как результат неправильного лечения, когда пациенты получают противотуберкулезные препараты в недостаточном количестве [6]. Кроме того, с начала терапии ТБ до выздоровления обычно проходит не менее полугод, и все это время контакты с инфицированным могут приводить к заражению [5]. Основным фактором, определяющим развитие резистентности под воздействием противотуберкулезных препаратов, является селекция лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий, несущих мутации в геноме.

Для России ТБ представляет одну из важнейших проблем, поскольку на сегодняшний день его распространен-



№	X	R1	R2	R3
1	ОН	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	ОН	ОН
2	ОН	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	ОН	ОН
3	ОН	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	ОН
4	NH <sub>2</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	ОН
5	ОН	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	ОН
6	NH <sub>2</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	ОН	ОН
7	NH <sub>2</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	ОН	ОН
8	ОН	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	ОН	ОН
9	ОН	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	ОН	N <sub>3</sub>
10	ОН	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	ОН	NH <sub>2</sub>

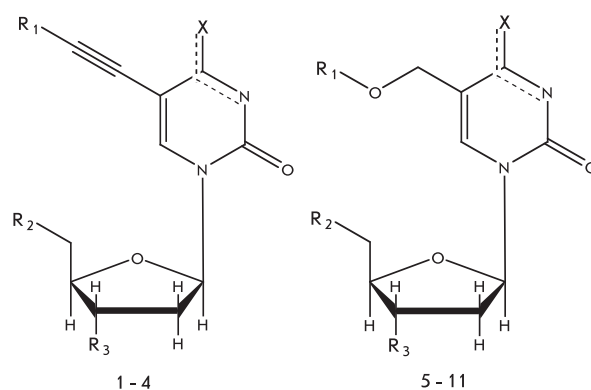


Рис. 1. Структура изучаемых соединений

ность составляет 190.5 случая на 100 тысяч населения, а заболеваемость – 85.1 на 100 тысяч населения, смертность – 17.9 на 100 тысяч. При этом, согласно статистическим данным МЗ и СР РФ, в России частота МЛУ-ТБ среди впервые выявленных составляет 13.6 %, а среди больных с рецидивами – 28.8 % [7]. В связи с вышесказанным необходим поиск принципиально новых противотуберкулезных препаратов.

Терапия вирусных инфекций часто основывается на использовании производных природных нуклеозидов [8]. Противотуберкулезная активность нуклеозидов до недавнего времени не была выявлена. В последнее время появились сообщения о нескольких группах модифицированных нуклеозидов, продемонстрировавших на экспериментальных моделях заметное антимикобактериальное действие [9–14].

Недавно показано, что 5-модифицированные пиримидиновые нуклеозиды с протяженными 1-алкильными заместителями обладают ингибирующей активностью в отношении *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis in vitro* [11–14]. Наилучшую антимикобактериальную активность продемонстрировали 5-(1-додецинильные) и 5-(1-тетрадецинильные) производные нуклеозидов. Изучение влияния модификации углеводного фрагмента на противобактериальные свойства 5-модифицированных нуклеозидов показало, что практически все 2'-дезоксиде-, 2',3'-дидезокси-, 2',3'-дидезокси-3'-фтор-, 2',3'-дидезокси-2'-фтор- нуклеозиды, а также ациклические и арабинонуклеозиды с протяженными 1-алкильными заместителями демонстрировали анти-ТБ-активность [11–14]. Настоящая работа посвящена изучению способности ингибировать рост *Mycobacterium tuberculosis* синтезированными нами 2'-дезоксиде-, 3'-азидо-2',3'-дидезокси- и 3'-амино-2',3'-дидезокси- пиримидиновыми нуклеозидами, содержащими в 5-м положении основания протяженные метилоксиалкильные заместители.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Исследуемые соединения (1 – 10, рис. 1).** 5-(1-додецинил)- и 5-(1-тетрадецинил)-2'-деоксиуридин (1 и 2, соответственно), используемые в качестве контроля, получены

по методу [11]. 5-метоксиалкильные производные пиримидиновых нуклеозидов (6–10) синтезированы по разработанному нами методу [15], 5'-монофосфаты нуклеозидов (3–5) по методу [15–16].

**Микобактериальный штамм.** Для проведения испытаний препаратов использовали чувствительный к противотуберкулезным препаратам лабораторный штамм *M. tuberculosis* H37Rv. Микобактерии были переведены в суспензию одиночных клеток в одинаковой фазе роста и стандартизованы по КОЕ [17]. В работе использовали обогащенную жидкую питательную среду Дюбо (Difco).

**Оценка эффективности препаратов.** Изучение влияния препаратов на рост микобактериального штамма проводили на автоматической системе детекции роста Bactec MGIT 960 (BD, USA) в течение 24 дней. Микобактериальную суспензию в объеме 500 мкл инокулировали в 7.9 мл питательной среды. Конечная концентрация *M. tuberculosis* в образце составляла 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> КОЕ/мл. Каждую из концентраций, включая контрольные пробики без препарата, исследовали при трех повторах.

Антимикобактериальное действие препаратов оценивали по динамике роста *M. tuberculosis* H37Rv в присутствии различных концентраций препаратов по сравнению с ростом штамма на среде, не содержащей препаратов [17]. Детекция роста проводилась каждый час автоматически и регистрировалась с помощью программного обеспечения Epicenter (BD, USA). Рост микобактериальных клеток выражался в относительных единицах флюоресценции (ОЕФ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами изучена способность ингибировать рост *M. tuberculosis* синтезированных производных 2'-дезоксинуклеозидов (6–10, рис. 1), в которых протяженный линейный алкильный заместитель введен в 5-е положение пиримидинового основания через метилокси-группу, что обеспечивает большую подвижность углеводородного радикала по сравнению с 1-алкильными производными (1 и 2), описанными в литературе [11–14]. Разработанный нами метод синтеза 5-метоксиалкильных производных пиримидиновых нуклеозидов [15] значительно проще и дешевле предложен-

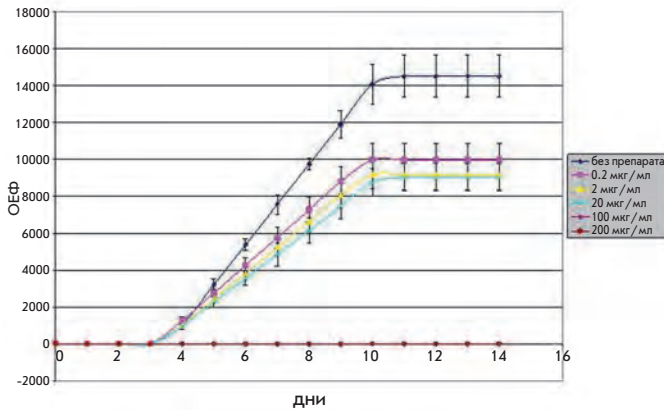


Рис. 2. Данные типичного эксперимента по проверке антимикобактериальной активности соединений. Диаграмма динамики роста культуры *M. tuberculosis* H37Rv под воздействием препарата **9** в различных концентрациях. ОЕФ – относительные единицы флюоресценции, регистрируемые с помощью программного обеспечения Epicenter (BD, USA)

ного способа получения 5-(1-алкинил)нуклеозидов [11–14]. Для выявления вклада 3'-модификации углеводного остатка в противотуберкулезную активность 5-модифицированных нуклеозидов были синтезированы производные 2'-дезоксигуанидина с одинаковым заместителем в пятом положении основания: 2'-дезоксид-, 3'-азидо-2',3'-дидезокси- и 3'-амино-2',3'-дидезокси-5-метилоксидодецилуридин (**8–10**, рис. 1).

Результаты определения бактериостатической активности (ингибирующих рост концентраций) препаратов по росту микобактерий в автоматизированной системе Bactec MGIT960 показали, что культура *M. tuberculosis* H37Rv, экспонированная со средой без добавления препаратов, дала рост через 3.59 сут. Кривая роста имела классический сигмоидный вид и состояла из трех фаз – фаза скрытого роста (до 3.59 сут), экспоненциальной (лог-фаза, или фаза активного деления микобактериальных клеток) – с 3.59 сут по 10.25 сут и стационарной фазы, когда количество клеток в культуре не увеличивалось – с 10.25 сут до даты окончания эксперимента (рис. 2). Продолжительность фазы активного деления составила 6.66 сут.

На первом этапе, с целью подтверждения антимикобактериальной активности нуклеозидов и отработки условий проведения эксперимента, были исследованы 5-(1-додецил) и 5-(1-тетрадецил)-2'-дезоксигуанидин (**1** и **2**), в концентрациях 2, 20 и 200 мкг/мл, согласно литературным данным подавлявшим рост *M. bovis* (МИК<sub>90</sub> 50 и 10 мкг/мл, соответственно) и на 50–70 % ингибирующим в высоких концентрациях рост *M. avium* [11]. Нами было показано, что оба препарата полностью подавляли рост культуры *M. tuberculosis* в концентрации 200 мкг/мл.

5-метоксисалкильные производные пиримидиновых нуклеозидов (**6**, **7**, **9** и **10**) и монофосфаты нуклеозидов **3–5** тестируются в концентрациях 0,2, 2, 20, 100 и 200 мкг/мл, а 5-метилоксидодецил-2'-дезоксигуанидин (**8**) – в концентрациях 0,2, 2, 20, 50 и 100 мкг/мл. Данные типичного экс-

перимента по проверке антимикобактериальной активности соединений приведены на рис. 2.

При исследовании антимикобактериального действия препаратов **6–10** на культуру *M. tuberculosis* H37Rv было показано, что препарат **6** вызывал 100 %-ное ингибирование роста при концентрациях 200 и 100 мкг/мл, **7** – 200 и 100 мкг/мл, **8** – 100 и 50 мкг/мл, **9** – 200 и 100 мкг/мл, **10** – 200 и 100 мкг/мл (рис. 2). Таким образом, минимальная ингибирующая концентрация (МИК) для препаратов **6**, **7**, **9** и **10** составила 100 мкг/мл и препарата **8** – 50 мкг/мл.

Нуклеозиды, содержащие в 5-м положении нуклеинового основания объемные гидрофобные группы, плохо растворимы в воде. Для повышения растворимости мы синтезировали 5'-монофосфаты нуклеозидов (**3-**) по методу [16], однако полученные соединения не ингибировали рост микобактерий даже в высокой (200 мкг/мл) концентрации, и параметры кривых роста культуры, культивируемой с этими препаратами, не отличались от контроля без препарата.

Нами была оценена продолжительность фазы активного роста культуры, экспонированной с тестируемыми препаратами, в концентрациях, не приводящих к 100 %-ному ингибированию роста культуры, по сравнению с контролем (рис. 3). Данные выражены в относительных единицах (ОЕ), вычисленных как отношение времени фазы активного деления культуры, растущей в присутствии препарата, к продолжительности фазы активного деления контрольной культуры (*M. tuberculosis* H37Rv без препаратов). Как видно из рис. 3, под действием 20 мкг 5-метилоксидодецил-2'-дезоксигуанидина (**8**) и 5-метилоксидодецил-3'-амино-2',3'-дидезоксиуридина (**10**) наблюдается увеличение продолжительности фазы активного деления, достоверно отличающееся от контроля ( $p \leq 0.01$ ), что свидетельствует о снижении интенсивности деления микобактериальных клеток в культуре. Следует отметить, что для этих

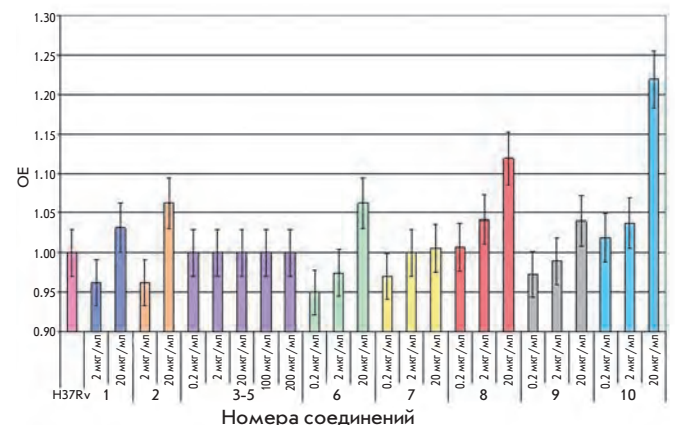


Рис. 3. Оценка эффективности препаратов, вызывающих ингибирование роста культуры *M. tuberculosis* при различных концентрациях. ОЕ – отношение продолжительности фазы активного деления культуры *M. tuberculosis* H37Rv, экспонированной с тестируемыми препаратами, к продолжительности фазы активного деления контрольной культуры, принятой за единицу

препаратов показана задержка начала роста микобактерий по сравнению с контролем на 24 ч (для препарата **8**) и на 18 ч (для препарата **10**).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Мы впервые показали, что производные 2'-дезоксиринидина и 2'-дезокситидина с протяженными метилоксиалкильными заместителями способны ингибировать рост культуры микобактерий *M. tuberculosis* H37Rv. 5-метилоксидодецил-2'-дезоксиринидин (**8**) можно признать наиболее активным в отношении *M. tuberculosis*, поскольку он имел наименьшую МИК из всех тестируемых соединений (50 мкг/мл), а его воздействие в концентрации, не вызывающей 100 %-ного ингибирования, приводило к наибольшему увеличению продолжительности фазы активного деления и максимальной задержке начала роста культуры. Тем не менее нами не выявлено принципиальных различий

в ингибирующем действии пиримидиновых нуклеозидов, различающихся как структурой заместителя в 5-м положении основания (1-алкинильный или метилоксиалкильный), так и углеводным фрагментом (2-дезокси-, 2,3-дидезокси-3-азидо- и 2,3-дидезокси-3-аминорибофураноза).

Таким образом, нами продемонстрирована способность 5-метилоксинуклеозидов производных пиримидиновых 2'-дезоксинуклеозидов ингибировать рост *M. tuberculosis in vitro*, наиболее эффективные из которых могут послужить прототипами для создания новых противотуберкулезных препаратов. ●

*Работа частично поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 08-04-00549).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Org., <http://www/who/int/mediacentre/factsheets/fs104/en/2005>
2. Banerjee R., Schechter G.F., Flood J., Porco T.C. // *Expert Rev. Anti Infect Ther.* 2008. V. 6. P. 713–24.
3. Bucher H.C., Griffith L.E., Guyatt G.H., Sudre P., Naef M., Sendi P., Battagay M. // *AIDS* 1999. V. 13. P. 501–507.
4. Daley C.L., Small P.M., Schechter G.F., Schoolnik G.K., McAdam R.A., Jacobs W.R., Hopewell P.C. // *N. Engl. J. Med.* 1992. P. 326. V. 231–235.
5. Ginsberg A.M., Spigelman M. // *Nat. Med.* 2007. V. 13. P. 290–4.
6. Tsuyuguchi I. // *Tuberculosis (Edinb.)* 2001. V. 81. P. 221–7.
7. Туберкулез в России. ООО «РПЦ Прима». М., 2009.
8. De Clercq E. // *Adv. Virus Res.* 2009. V. 73. P. 1–53.
9. Van Calenbergh S. // *Verh K Acad. Geneeskdg Belg.* 2006. V. 68. P. 223–48.
10. Gupte A., Boshoff H.I., Wilson D.J., Neres J., Labello N.P., Somu R.V., Xing C., Barry III C.E., Aldrich C.C. // *J. Med. Chem.* 2008. 51. 7495–7507.
11. Rai D., Johar M., Manning T., Agrawal B., Kunimoto D.Y., Kumar R. // *J. Med. Chem.* 2005. 48. 7012–7017.
12. Rai D., Johar M., Srivastav N.C., Manning T., Agrawal B., Kunimoto D. Y., Kumar R. // *J. Med. Chem.* 2007. 50. 4766–4774.
13. Johar M., Manning T., Tse C., Desroches N., Kunimoto D.Y., Agrawal B., Kumar R. // *J. Med. Chem.* 2007. 50. 3696–3705.
14. Srivastav N.C., Manning T., Kunimoto D.Y., Kumar R. // *Bioorganic & Medical Chemistry.* 15. 2007. 2045–2053.
15. Alexandrova L.A., Skoblov A.Yu., Jasko M.V., Victorova L.S., Kravetsky A.A. // *Nucl. Acids Res.* 1998. 26. № 3. 778–786.
16. Дяткина Н.Б., фон Янта-Липински М., Минасян Ш.Х., Куханова М.К., Краевский А.А., Чиджавадзе З.Г., Бибилашвили Р.Ш. // *Биоорганическая химия.* 1987. Т. 13. С. 1366–1374.
17. Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Кузьмин А.В. // *Пробл. туб. и болезн. легк.* 2006. № 12. С. 43–48.



УДК 571.27:578.224

# Индукция протективного гетеросубтипического иммунного ответа против вируса гриппа при иммунизации рекомбинантными аденовирусными векторами, экспрессирующими гемагглютинин вируса гриппа H5

М.М. Шмаров<sup>1\*</sup>, Е.С. Седова<sup>1</sup>, Л.В. Верховская<sup>1</sup>, И.А. Руднева<sup>2</sup>, Е.А. Богачева<sup>1</sup>, Ю.А. Барыкова<sup>1</sup>, Д.Н. Щербинин<sup>1</sup>, А.А. Лысенко<sup>1</sup>, И.Л. Тутьихина<sup>1</sup>, Д.Ю. Логунов<sup>1</sup>, Ю.А. Смирнов<sup>2</sup>, Б.С. Народицкий<sup>1</sup>, А.Л. Гинцбург<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

\*E-mail: mmshmarov@gmail.com

**РЕФЕРАТ** Вирусы гриппа характеризуются большой антигенной вариабельностью, что приводит к ежегодному возникновению эпидемий, а через нерегулярные интервалы времени – пандемий, вызываемых вирусами гриппа с новыми антигенными и биологическими свойствами. Решить проблему защиты населения от эпидемий вируса гриппа могут помочь новые подходы к вакцинации, одним из которых является применение генетических вакцин, созданных на основе аденовирусных векторов. Рекомбинантные аденовирусные векторы, несущие гены гемагглютинина вирусов гриппа птиц H5N1 и H5N2 (Ad-NA5-1 и Ad-NA5-2), были получены с использованием системы AdEasy Adenoviral Vector System (Stratagene). Лабораторные мыши были двукратно интраназально иммунизированы Ad-NA5-1 и Ad-NA5-2. Показано, что иммунизация рекомбинантными аденовирусами, несущими ген гемагглютинина вируса гриппа H5, обеспечивает индукцию протективного иммунного ответа, защищающего иммунизированных мышей не только от летальной дозы вируса гриппа H5 другого субтипа, но и от летальной дозы вируса гриппа подтипа H1, относящегося к тому же клайду, что и H5, но не обеспечивает защиту мышей против вируса гриппа подтипа H3, относящегося к другому клайду.

Полученные нами данные позволяют сделать вывод, что аденовирусные векторы могут служить универсальной платформой для получения вакцин как от сезонных, так и от пандемических штаммов вируса гриппа.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** аденовирусный вектор, вирус гриппа, гемагглютинин, иммунизация, гетеросубтипическая защита.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирусы гриппа А способны вызывать чрезвычайные эпидемические ситуации. Эти вирусы широко распространены в природе и могут поражать людей, многие виды млекопитающих (лошадей, свиней, тюленей и т.д.), а также все виды птиц [6, 17]. Традиционно для обозначения различных штаммов вируса гриппа используются цифровые индикаторы подтипов их поверхностных антигенов – гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA). Всего идентифицировано 15 подтипов гемагглютинина и 9 подтипов нейраминидазы,

с минимальной перекрестной активностью между подтипами в серологических реакциях [18]. В настоящее время среди людей циркулируют вирусы двух подтипов гемагглютинина (H1, H3) и двух нейраминидазы (N1—N2) [18, 20]. Кроме того, потенциальную угрозу для человека представляют вирусы гриппа птиц, содержащие гемагглютинин H5, т.к. начиная с 1997 г. неоднократно регистрировались случаи заболевания людей вирусами субтипа H5N1. Этот вирус был впервые детектирован у человека в Китае более 10 лет назад [7], и, по данным ВОЗ, общее количество случаев заболеваний

человека вирусом H5N1 составляет 478, из которых 286 – с летальным исходом (данные ВОЗ от 17.02.10).

Вирусы гриппа А характеризуются большой антигенной вариабельностью. Наиболее подвержены изменениям поверхностные гликопротеины вириона – гемагглютинин и нейраминидаза. Известны два пути изменения. Первый – антигенный дрейф. Под давлением популяционного иммунитета мутации, позволяющие уйти из-под контроля иммунной системы, дают вирусу серьезное преимущество и закрепляются. В итоге новые антигенные варианты гемагглютинина и нейраминидазы постоянно сменяют друг друга. В результате возникают эпидемии, т.к. защита от предыдущих штаммов вирусов, в т.ч. того же самого субтипа, недостаточна для нейтрализации нового штамма.

К сожалению, применение современных субъединичных и инактивированных вакцин не решает эту проблему, т.к. обеспечивает хорошую защиту только от штамма, из которого они были получены. Поэтому в настоящее время для защиты населения от новых эпидемических штаммов требуется постоянно создавать новые вакцины.

Второй путь изменения вирусов гриппа – антигенный шифт, т.е. изменение антигенной формулы вируса в результате замены гена (генов) и соответствующего белка (белков). В основе механизма антигенного шифта лежит реассортация или рекомбинация генов, которая может происходить при совместной инфекции двумя и более вирусами [19]. Шифтовые изменения, как правило, затрагивают антигенную структуру гемагглютинина, реже – нейраминидазы. Таким образом, через нерегулярные интервалы времени появляются пандемические варианты вирусов гриппа с новыми антигенными и биологическими свойствами, которые вызывают тяжелые заболевания и гибель людей [6, 17]. Например, пандемия «испанки» – вируса гриппа H1N1, в 1918–1920 гг. привела к смерти около 50 млн человек по всему миру. В июне 2009 г. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) присвоила новому вирусу H1N1, случаи заболевания которым начали детектировать в начале апреля 2009 г., шестую степень угрозы пандемии. Этот вирус представляет собой реассортант, содержащий гены птичьего, человеческого и свиного вирусов [8].

При возникновении нового пандемического штамма создание вакцины занимает слишком много времени, что не позволяет быстро остановить распространение опасного вируса. Для решения этой проблемы необходимы новые подходы к вакцинации против вируса гриппа. Одним из таких подходов являются генетические вакцины, базирующиеся на вирусных векторах [5, 11]. Наиболее перспективными представляются генетические вакцины, созданные с использованием аденовирусных векторов [1, 2].

Долгое время считалось, что гриппозные вакцины, в т.ч. и генно-инженерные, действующим началом которых являются вариабельные поверхностные белки вируса гриппа (гемагглютинин и/или нейраминидаза), строго специфичны и защищают только от того штамма, антиген которого присутствует в вакцинном препарате. Однако в последние годы (2008–2009) появились работы, согласно которым генетические вакцины на основе аденовирусов, несущих ген гемагглютинина вируса гриппа А, способны индуцировать перекрестный иммунитет как в пределах одного субтипа вируса гриппа [3], так и между разными

субтипами вируса, включающими один и тот же подтип гемагглютинина [15].

Такой эффект объясняется тем, что при вакцинации аденовирусными векторами в организм вводится ген гемагглютинина вируса гриппа, который эффективно экспрессируется в клетке и экспонируется на плазматической мембране, что позволяет сохранить его нативную третичную структуру. При этом индуцируется как клеточный, так и гуморальный ответ на консервативные эпитопы гемагглютинина вируса гриппа. Так, показано, что антитела, полученные из плазматических клеток людей, инфицированных вирусом гриппа H5N1, могут обеспечивать перекрестную нейтрализацию вирусов подтипа H1 [4]. В 2008 г. были опубликованы данные, согласно которым вирусы гриппа (по наличию высококонсервативных конформационных эпитопов в составе гемагглютинина для антител широкого спектра действия) можно разделить на две группы. Первая группа содержит подтипы H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 и H16, а вторая – подтипы H3, H4, H7, H10, H14 и H15. Антитела против антигенных детерминант вирусов первой группы в разной степени обеспечивают нейтрализацию этих подтипов, но не обеспечивают нейтрализацию подтипов из второй группы [14]. Эти группы, в соответствии с наличием консервативных эпитопов, были разделены на четыре подгруппы, или клайда: H1 (H1, H2, H5, H6, H11, H13 и H16 гемагглютинины), H9 (H9, H8 и H12), H7 (H15, H7 и H10) и H3 клайд (H3, H14 и H4).

Таким образом, нами было высказано предположение о том, что вакцинация аденовирусным вектором, несущим ген гемагглютинина вируса гриппа А, может приводить к образованию антител к консервативным, в т.ч. конформационным, эпитопам основного поверхностного антигена вируса гриппа А, что обеспечит перекрестный иммунный ответ не только против вирусов гриппа А внутри одного подтипа, но и против вирусов гриппа А разных подтипов, относящихся к одному клайду.

В настоящей работе использовались рекомбинантные аденовирусы человека пятого серотипа, несущие гены гемагглютининов вируса гриппа птиц H5N2 и H5N1, т.к. вирусы гриппа птиц подтипа H5 являются вероятными кандидатами на роль следующего пандемического штамма. Было показано, что иммунизация рекомбинантными аденовирусами обеспечивает индукцию протективного иммунного ответа, защищающего иммунизированных мышей не только от летальной дозы вируса гриппа «своего» штамма H5, но и от летальной дозы вируса гриппа H5 другого субтипа, а также летальной дозы вируса гриппа подтипа H1, относящегося к тому же клайду, что и H5, но не обеспечивает протекцию мышей против вируса гриппа подтипа H3, относящегося к другому клайду.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Вирусы.** В работе использовали вирус гриппа птиц A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), вирусы гриппа человека A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2), адаптированные для мышей [9]. Вирусы были накоплены в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов при 37 °С в течение 48 ч. Вирусодержащая аллантоисная жидкость хранилась при -70 °С. Титр вируса был определен титрованием в куриных эмбрионах. 50 %-ная летальная доза (LD<sub>50</sub>) была определена путем титрования на мышах.

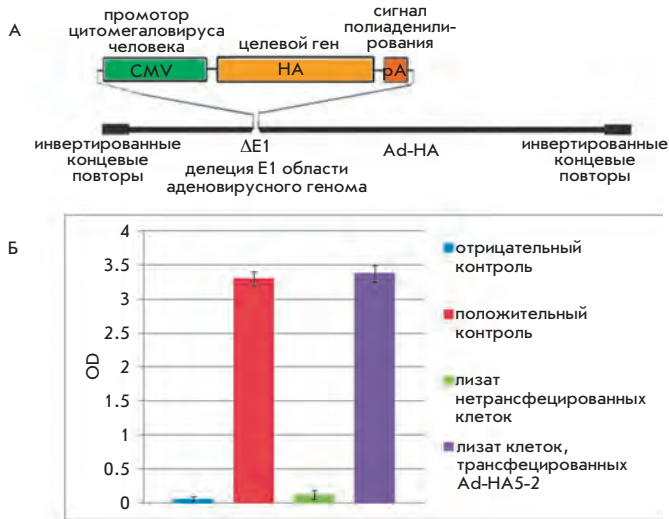


Рис. 1. Рекombинантный аденовирус человека пятого серотипа экспрессирует гемагглютинин вируса гриппа птиц H5N2 (A/Mallard/Pennsylvania/10218/84) в инфицированных клетках. А. Схема генома рекombинантного аденовируса, несущего гемагглютинин вируса гриппа. В. Экспрессия гемагглютинина вируса гриппа H5N2 клеточной линией 293 эмбриональной почки человека, инфицированной Ad-НА5-2 (ИФА): ■ – отрицательный контроль, ■ – положительный контроль, ■ – лизат клеток, нетрансфицированных Ad-НА5-2, ■ – лизат клеток, трансфицированных Ad-НА5-2

**Получение рекombинантного аденовируса.** Для получения плазмид и рекombинантных аденовирусных векторов использовали гены гемагглютинина вируса гриппа птиц штамма A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) и A/Duck/Novosibirsk/56/2005 (H5N1) (H5-2 и H5-1, соответственно). кДНК генома вируса A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) была получена методом обратной транскрипции с использованием Reverse Transcription System (Invitrogene, USA). Ген гемагглютинина HA5-2 был получен путем амплификации кДНК с праймерами, фланкирующими последовательность гена гемагглютинина.

Ген гемагглютинина H5-1 был предоставлен лабораторией диагностики вирусных болезней птиц Федерального государственного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных города Владимир» (ФГУФЦО ЗЖ).

Для получения рекombинантных аденовирусов Ad-НА5-1 и Ad-НА5-2 методом гомологичной рекombинации в клетках E.coli была использована система AdEasy Adenoviral Vector System (Stratagene). Полученные препараты рекombинантных аденовирусов были очищены и сконцентрированы двукратным ультрацентрифугированием в градиенте хлористого цезия.

В качестве контроля использовался рекombинантный аденовирус человека пятого серотипа без экспрессирующей кассеты в участке делеции E1 области генома (Ad-null).

Титры препаратов Ad-НА5-1, Ad-НА5-2 и Ad-null определяли методом бляшкообразования на культуре клеток HEK-293.

**Детекция экспрессии гена гемагглютинина вируса гриппа птиц методом ИФА.** Детекцию экспрессии генов гемагглютинина в составе рекombинантных аденовирусов проводили на клетках линии HEK-293, к которым добавляли аденовирусные векторы Ad-НА5-1 и Ad-НА5-2 в дозе 100 частиц на клетку. После 24 ч инкубации клетки лизировали. Для постановки ИФА использовали набор для детекции гемагглютинина вируса гриппа птиц А штамма H5 (BioAssay).

**Определение уровня гемагглютинин-связывающих антител в сыворотках крови мышей.** Определения уровня антител в сыворотках крови мышей проводили через 21 день после второй иммунизации. Для определения уровня гемагглютинин-связывающих антител в сыворотке крови мышей использовали реакцию торможения гемагглютинина, в соответствии с протоколом WHO/CDS/CRS/NCS/2002.5 с использованием куриных эритроцитов.

**Мыши.** В работе были использованы мыши линии BALB/c, весом 7–9 г, самки.

**Иммунизация животных.** Мыши были разбиты на группы (по 10 особей в группе) и иммунизированы двукратно интраназально рекombинантными аденовирусами Ad-НА5-1 и Ad-НА5-2 в количестве  $10^8$  БОЕ/мышь. Интервал между иммунизациями составил 21 день. Контрольным группам были введены аденовирусный вектор Ad-null или фосфатный буфер PBS.

**Заражение животных.** Через 21 день после второй иммунизации мышам под легким эфирным наркозом интраназально вводили высокую летальную дозу ( $50 LD_{50}$ ) вируса гриппа штаммов A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) или летальные дозы ( $10 LD_{50}$ ) вирусов гриппа A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2). Выживаемость и изменение веса мышей оценивали в течение 16 дней после заражения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Детекция экспрессии генов гемагглютинина в составе рекombинантных аденовирусов Ad-НА5-1 и Ad-НА5-2.** Схема генома рекombинантных аденовирусов Ad-НА5-1 и Ad-НА5-2, которые были получены методом гомологичной рекombинации в клетках E.coli, представлены на рис. 1А. В полученных препаратах аденовирусных векторов методом ПЦР было показано наличие в составе геномной ДНК вставок генов гемагглютинина вируса гриппа птиц штаммов H5N1 и H5N2 (данные не представлены).

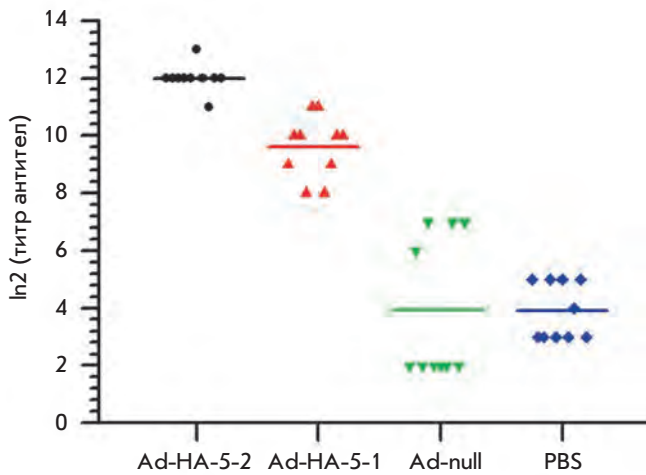
В результате анализа лизата клеток линии HEK-293, инфицированных рекombинантным аденовирусом Ad-НА5-2, ELISA набором для детекции гемагглютинина вируса гриппа птиц H5 был определен уровень экспрессии рекombинантного гемагглютинина H5 (рис. 1Б).

Таким же образом была подтверждена экспрессия аденовирусным вектором Ad-НА5-1 гена гемагглютинина вируса гриппа птиц штамма H5N1 (данные не представлены).

**Определение иммуногенности гемагглютинина, экспрессируемого аденовирусом Ad-НА5-2 и перекрестной иммуногенности гемагглютинина, экспрессируемого аденовирусом Ad-НА5-1.**

Уровень антител к гемагглютину, экспрессируемому рекombинантным аденовирусом Ad-НА5-2, определяли





**Рис. 2.** Уровень специфических гемагглютинирующих антител к вирусу гриппа птиц H5N2 в сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантными аденовирусами Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2. Мыши были двукратно иммунизированы аденовирусами Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2. В качестве контроля использовали мышей, которым двукратно вводился Ad-null и фосфатный буфер PBS. Титр антител в сыворотках крови мышей определялся в РТГА против вируса гриппа A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2). Между вакцинированными Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2 группами и контрольными Ad-null и PBS группами было зафиксировано достоверное различие ( $p < 0.05$ )

в РТГА. Для этого мышей линии BALB/c иммунизировали аденовирусом Ad-HA5-2. В качестве контрольных использовались группы мышей, которым вводили фосфатный буфер PBS. Полученные через 21 день после повторной иммунизации сыворотки анализировали на наличие специфических антител к гемагглютинуину вируса гриппа птиц штамма A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2). Результаты РТГА представлены на рис. 2. В сыворотке мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-2, был определен высокий уровень антител, препятствующих агрегляции эритроцитов вирусом гриппа птиц H5N2.

Полученные данные свидетельствуют об индукции гуморального иммунного ответа, специфического к вирусу гриппа птиц H5N2, в ответ на интраназальное введение рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего ген гемагглютинаина H5.

Аналогичным образом проводили оценку перекрестной иммуногенности белка гемагглютинаина, экспрессируемого аденовирусным вектором Ad-HA5-1. Полученные после иммунизации образцы сывороток были проанализированы на наличие специфических антител к гемагглютинуину вируса гриппа птиц штамма A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) методом РТГА (рис. 2). В сыворотках крови мышей был определен высокий уровень антител, препятствующих агрегляции эритроцитов вирусом гриппа птиц H5N2.

Полученные результаты свидетельствуют об индукции гетеросубтипического перекрестного гуморального иммунного ответа, специфического к вирусу гриппа птиц

H5N2, индуцируемого в ответ на иммунизацию мышей рекомбинантным аденовирусом, несущим ген гемагглютинаина вируса гриппа птиц H5N1. Количество антител к гемагглютинуину вируса гриппа H5N1 хоть и ниже, чем при иммунизации мышей аденовирусным вектором с гемагглютинином вируса гриппа H5N2, но достаточно высок по сравнению с контрольной группой.

В контрольных (PBS) сыворотках наблюдалось неспецифическое торможение гемагглютинации за счет компонентов сыворотки крови мышей.

**Защита мышей, иммунизированных Ad-HA5-2, и перекрестная защита мышей, иммунизированных Ad-HA5-1, против заражения вирусом гриппа птиц H5N2.** Для изучения протективного действия двукратной иммунизации аденовирусом Ad-HA5-2 иммунизированных животных заражали летальной дозой (50 LD<sub>50</sub>) вируса гриппа A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2). Мышам контрольных групп вводили рекомбинантный аденовирус Ad-null и фосфатный буфер PBS. Мыши, иммунизированные рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-2, после заражения вирусом гриппа не теряли в весе и показали 100 %-ную выживаемость. При этом в контрольной группе PBS наблюдалась гибель 100 % мышей в течение 10 дней и падение веса на 20 %, а в контрольной группе, иммунизированной Ad-null, выжило 20 % мышей, и падение веса составило около 30 % (рис. 3).

Таким образом, иммунизация рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-2 обеспечивает защиту мышей против заражения летальной дозой вируса гриппа H5N2.

Для изучения возможности формирования перекрестного протективного иммунного ответа мышей иммунизировали, как описано ранее, рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-1 и так же заражали летальной дозой (50 LD<sub>50</sub>) вируса A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2). Показано, что иммунизация мышей аденовирусом Ad-HA5-1 приводит к формированию гетеросубтипического перекрестного иммунного ответа против вируса гриппа H5N2. Иммунизированные аденовирусом мыши не теряли в весе и продемонстрировали 100 %-ную выживаемость (рис. 3).

**Определение перекрестной иммуногенности гемагглютинаина, экспрессируемого аденовирусом Ad-HA5-2, против вирусов гриппа H1N1 и H3N2.**

Оценку перекрестной иммуногенности рекомбинантного гемагглютинаина, экспрессируемого аденовирусом Ad-HA5-2, проводили в РТГА. Для этого мышей линии BALB/c иммунизировали аденовирусом Ad-HA5-2, как описано ранее. Мышам контрольной группы вводили интраназально фосфатный буфер. Образцы сывороток у мышей отбирали через 21 день после повторной иммунизации. Полученные образцы сывороток анализировали на наличие антител к гемагглютинуину вирусов гриппа штаммов A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2) (результат представлен на рис. 4). В сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-2, был детектирован достоверный прирост титра антител в РТГА к вирусу H1N1 в сравнении с контрольной группой. Разница между уровнем антител в РТГА против вируса H3N2, в иммунизированной Ad-HA5-2 группе, и уровнем неспецифического торможения гемагглютинации за счет компонентов сыворотки крови мышей была статистически не достоверна.

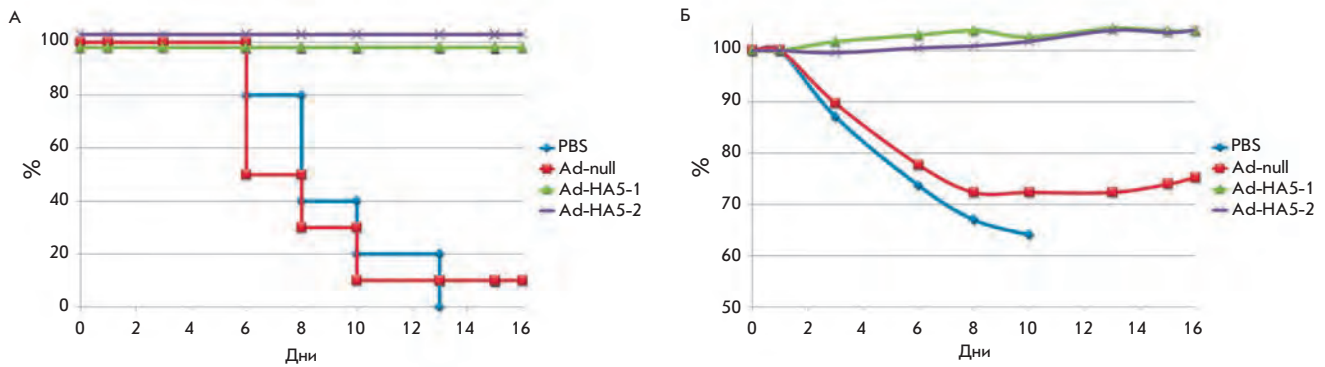


Рис. 3. Анализ протективности гемагглютинин-специфического иммунного ответа мышей, иммунизированных рекомбинантными аденовирусами Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2, с последующим заражением летальной дозой вируса гриппа птиц H5N2. А. Выживаемость мышей, зараженных летальной дозой (50LD<sub>50</sub>) вируса гриппа штамма A/Mallard/Pennsylvania/10218/84H5N2 (H5N2). Мыши были двукратно иммунизированы аденовирусами Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2. В качестве контроля использовали мышей, двукратно иммунизированных Ad-null и фосфатным буфером PBS. Различия между выживаемостью в группах Ad-HA5-2 (Ad-HA5-1) и контрольной группой PBS ( $p < 0.00001$ ), а также контрольной группой Ad-null ( $p < 0.0001$ ) являются статистически достоверными. В. Изменение веса мышей, зараженных летальной дозой (50LD<sub>50</sub>) вируса гриппа штамма A/Mallard/Pennsylvania/10218/84H5N2 (H5N2)

Полученный результат свидетельствует об индукции гуморального иммунного ответа, специфичного к вирусу гриппа H1N1, в ответ на введение рекомбинантного аденовируса Ad-HA5-2. При этом уровень гуморального иммунного ответа, специфического к вирусу гриппа H3N2, можно считать незначительным.

**Изучение перекрестной защиты мышей, иммунизированных Ad-HA5-2, против вирусов гриппа А H1N1 и H3N2.** После двукратной иммунизации Ad-HA5-2 мыши были заражены летальными дозами (10 LD<sub>50</sub>) вирусов A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2). Мышам контрольной группы вводили интраназально фосфатный буфер. Эксперимент показал, что иммунизация животных рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-2 обеспечивает протекцию мышей против заражения летальной дозой вируса гриппа А H1N1. В течение всего срока наблюдения животные не гибли, и падение их веса составило 5%. В контрольной группе PBS наблюдалась гибель 100% мышей в течение 9 дней и падение веса животных на 30%. При этом иммунизация мышей аденовирусом Ad-HA5-2 не обеспечивала защиту мышей против заражения летальной дозой вируса гриппа А H3N2: иммунизированные мыши показали только 20%-ную выживаемость и почти 40%-ную потерю веса (рис. 5).

**Обсуждение.** Защита человека от постоянных атак вирусов гриппа осложняется трудностью прогнозирования появления новых пандемических и эпидемических штаммов, а также низкой перекрестной реактивностью инактивированных и субъединичных вакцин, которые обеспечивают хорошую защиту только от того штамма вируса гриппа, против которого они были произведены. Вакцинация, обеспечивающая широкую перекрестную защиту против потенциально опасных штаммов вируса гриппа, является пока труднодостижимой целью.

Известно, что при заболевании вирусом гриппа возможно формирование гетеросубтипического иммунитета, основанного как на гуморальном, так и на клеточном иммунном ответе. Гетеросубтипический иммунитет может значительно сократить срок заболевания и ослабить симптомы при последующем заражении другим штаммом вируса гриппа [21]. Формирование гетеросубтипического иммунного ответа в том числе связано с наличием консервативных для различных штаммов конформационных эпитопов гемагглютининов вируса гриппа.

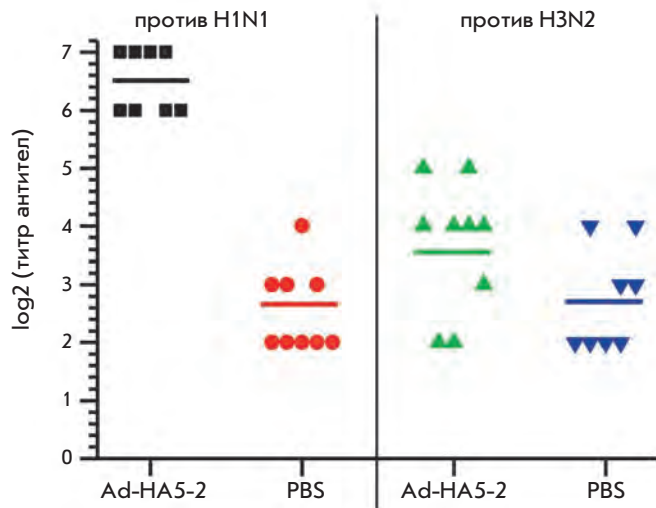


Рис. 4. Уровень специфических гемагглютинирующих антител к вирусам гриппа H1N1 и H3N2 в сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-2. Мыши были двукратно иммунизированы аденовирусом Ad-HA5-2. В качестве контроля использовали мышей, двукратно иммунизированных фосфатным буфером PBS. Титр антител в сыворотках крови мышей определялся в РТГА против вирусов гриппа A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2). Различия между вакцинированными и контрольными группами для РТГА против вируса гриппа H1N1 были статистически достоверны ( $p = 0.05$ ), а для РТГА против вируса гриппа H3N2 статистически недостоверны ( $p > 0.05$ )

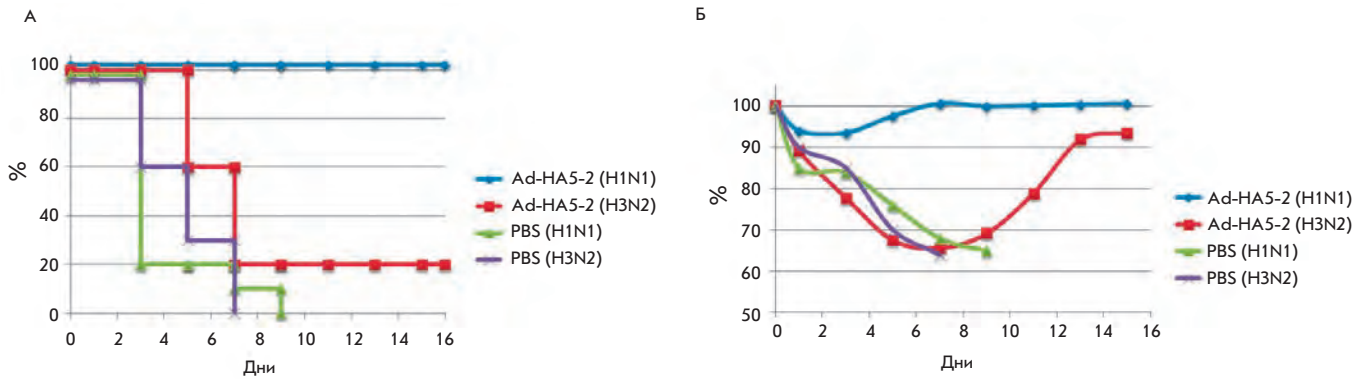


Рис. 5. Анализ протективности геммагглютинин-специфического иммунного ответа мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-2, против заражения летальной дозой вирусов гриппа H1N1 и H3N2. А. Выживаемость мышей, зараженных летальной дозой (10LD<sub>50</sub>) вирусов гриппа штаммов A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2). Мыши были двукратно иммунизированы аденовирусом Ad-HA5-2 в концентрации 10<sup>8</sup> БОЕ/мышь. В качестве контроля использовали мышей, которым двукратно вводили фосфатный буфер PBS. Различия между выживаемостью в группе Ad-HA5-2 и контрольной группе PBS (заражение H1N1) являются статистически достоверными (p<0.0007), различия между выживаемостью в группе Ad-HA5-2 и контрольной группе PBS (заражение H3N2) являются статистически не достоверными (p=0.5). В. Изменение веса мышей, зараженных летальной дозой (10LD<sub>50</sub>) вирусов гриппа штаммов A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2)

Ранее было описано существование конформационного эпитопа у геммагглютинаина вируса гриппа А, общего для вирусов нескольких подтипов [10]. Согласно недавним исследованиям, различные подтипы вируса гриппа разделены на группы (клайды) по наличию консервативных эпитопов геммагглютинаина, антитела к которым способны нейтрализовать широкий спектр вирусных подтипов. Это объясняется генетическим родством между геммагглютинаинами различных подтипов вирусов гриппа. На рис. 6 показано филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей геммагглютининов вирусов гриппа А разных подтипов. Вирусы H1, H2 и H5 подтипов являются генетически родственными между собой и поэтому имеют общие конформационные эпитопы, в то время как вирусы H9, H7 и H3

подтипов имеют низкую степень гомологии, и, как следствие, перекрестного иммунитета между этими подтипами не образуется. Так как в первый клайд входят подтипы вирусов гриппа, имеющие пандемический потенциал, такие как H5, H1 и H2, это делает вакцины широкого спектра действия в пределах этой группы особенно ценными [12].

Таким образом, вакцины, сохраняющие стабильную третичную структуру поверхностных антигенов, должны обеспечивать хорошую защиту от разных штаммов вируса гриппа. При получении субъединичных и инактивированных вакцин структура поверхностных антигенов вируса гриппа может нарушаться, а применение живых гриппозных вакцин позволяет получить антитела широкого спектра действия, но связано с рядом существенных ограничений.

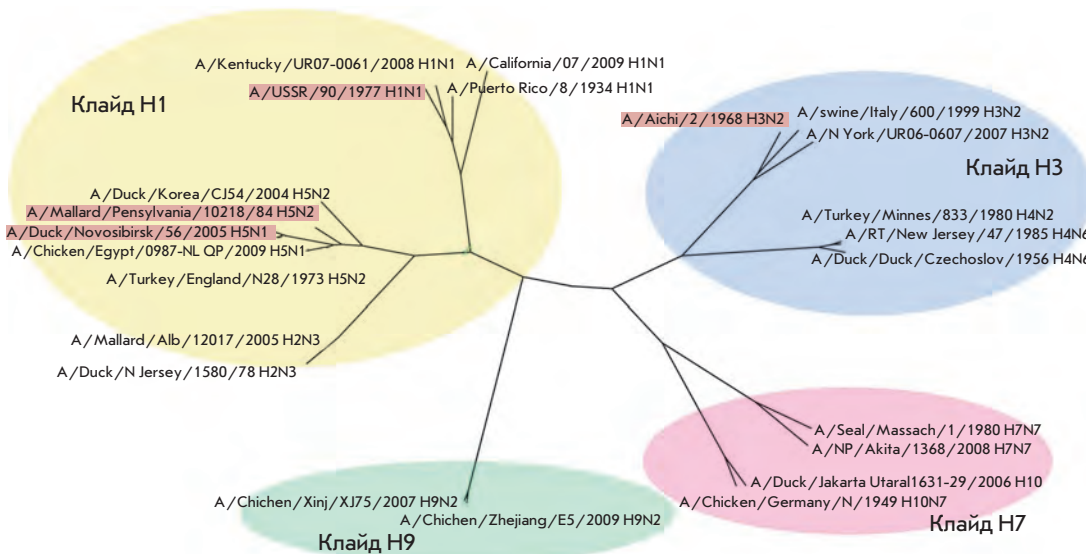


Рис. 6. Филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей геммагглютининов вирусов гриппа А разных субтипов. Вирусы гриппа различных субтипов объединены в четыре клайда на основании степени их филогенетического родства. И использованные в данной работе штаммы вирусов (выделенные цветом), относятся к клайдам H1 и H3



Иммунизация рекомбинантными аденовирусными векторами, несущими гены поверхностных белков вируса гриппа, приводит к экспрессии на клеточной поверхности антигенов вируса гриппа с сохраненной третичной структурой, что позволяет добиться формирования гетеросубтипического иммунитета, в т.ч. антител широкого спектра действия к консервативным эпитопам гемагглютиниона.

В данной работе использовались аденовирусные вектора с делетированными E1 и E3 областями генома аденовируса, что позволяет получать репликативно-дефектные аденовирусные частицы и делает возможным их потенциальное использование в качестве вакцинных препаратов. К преимуществам рекомбинантных аденовирусов относятся высокий уровень экспрессии трансгена в широком диапазоне эукариотических клеток, индукция как гуморального, так и клеточного иммунного ответа на трансгенный продукт, а также безопасность для человека, показанная на добровольцах [16]. В 2008 г. в США была успешно проведена первая фаза клинических испытаний назальной вакцины на основе рекомбинантного репликативно-дефектного аденовируса человека пятого серотипа, несущего ген гемагглютиниона, против вируса гриппа H5 [13].

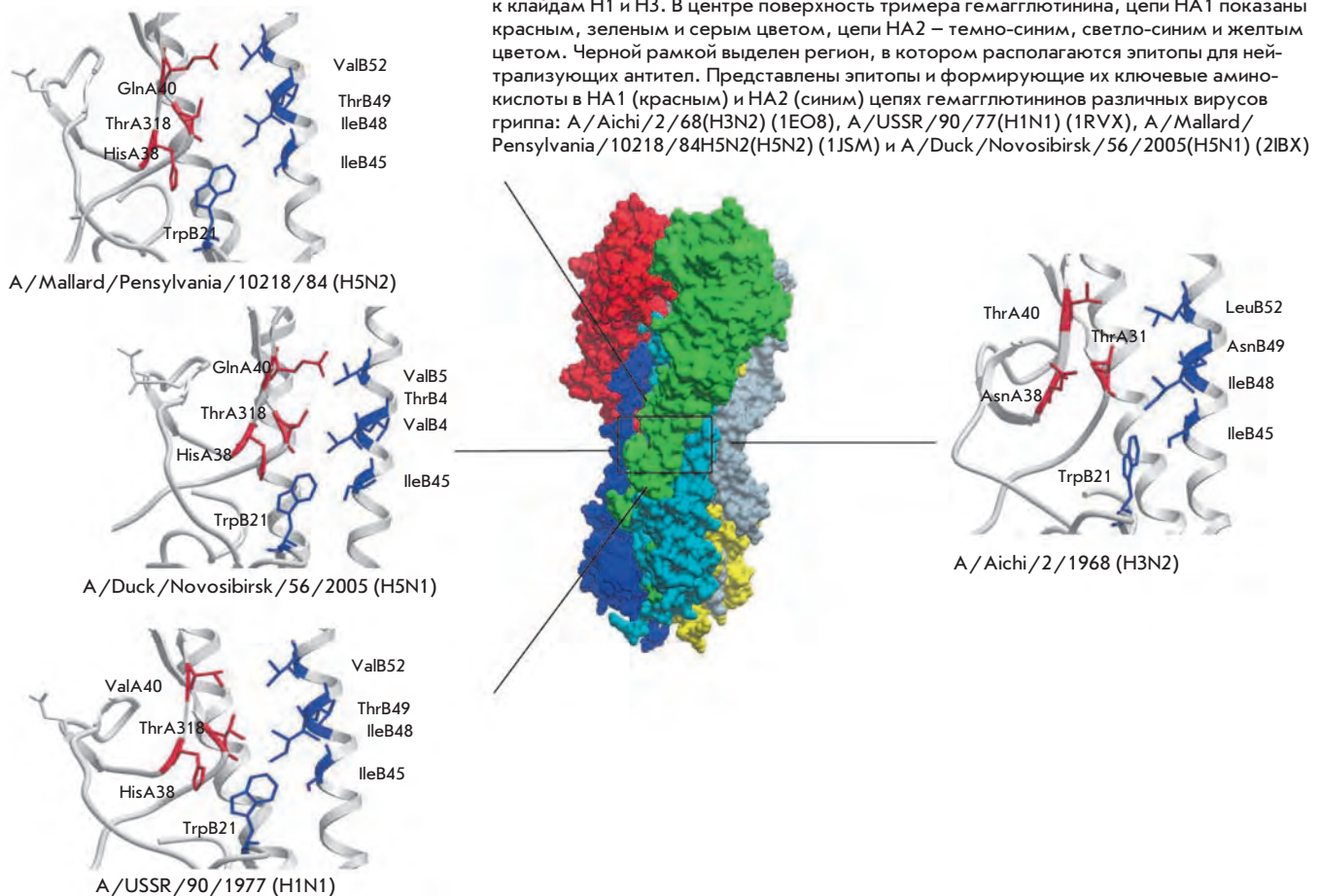
В нашей работе были использованы гены гемагглютининов аденовирусов гриппа А птиц H5N1 и H5N2, т.к. вирусы гриппа

птиц, и особенно штамм H5N1, вызывают сейчас наибольшие опасения. Этот вирус характеризуется более чем 50 %-ной летальностью среди людей, и в случае приобретения им способности передаваться от человека к человеку может привести к пандемии с огромными человеческими жертвами.

Нами были сконструированы аденовирусные вектора Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2 на основе аденовируса человека пятого серотипа, несущие гены гемагглютининов вирусов гриппа A/Duck/Novosibirsk/56/2005 (H5N1) и A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2). Анализ аминокислотной последовательности гемагглютининов этих вирусов показал гомологию между ними в 94.6 % (<http://align.genome.jp/>).

Проверка иммуногенности полученного нами аденовируса Ad-HA5-2 показала, что в ответ на двукратное интраназальное введение рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего ген гемагглютиниона вируса H5N2, у мышей происходит выработка высокого уровня антител, специфичных к вирусу гриппа птиц A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2).

Также показано, что двукратная иммунизация мышей аденовирусом Ad-HA5-1, несущим ген гемагглютиниона вируса гриппа H5N1, приводит к образованию высокого титра перекрестных антител к вирусу гриппа птиц A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2).



Иммунизация мышей аденовирусами Ad-NA5-2 и Ad-NA5-1 обеспечивает защиту от высокой летальной дозы (50 LD<sub>50</sub>) вируса гриппа A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2). На примере иммунизации мышей аденовирусным вектором Ad-null, не несущим экспрессирующей кассеты с геном, был оценен вклад самого вектора в защиту против вируса гриппа А, и показано, что иммунизация Ad-null защищает 20 % животных от вируса гриппа. По-видимому, это объясняется индукцией неспецифического противовирусного иммунитета в ответ на введение аденовирусного вектора в организм животных.

Таким образом, продемонстрирована возможность формирования рекомбинантным аденовирусом, несущим ген гемагглютинаина вируса гриппа H5N2, гетеросубтипического иммунитета между субтипами H5N1 и H5N2 вируса гриппа.

Для проверки предположения об индукции у иммунизированных рекомбинантным аденовирусом мышей антител широкого спектра действия, способных нейтрализовать вирусы гриппа разных подтипов, относящихся к клайду H1 (H1, H2, H5, H6, H11, H13 и H16), нами были использованы вирусы A/USSR/90/77 (H1N1), относящиеся к данному клайду, и A/Aichi/2/68 (H3N2), не входящий в него. Согласно работе Throsby M. и коллег [14], гемагглютинины вирусов H5 и H1 имеют общий консервативный эпитоп, образованный аминокислотами His38, Gln40, Thr318 в HA1 субъединице гемагглютинаина и Ile45, Ile48, Thr49 и Val52 в HA2 субъединице гемагглютинаина, тогда как гемагглютинины вирусов H3 имеют в положениях 38 и 40 субъединицы HA1 вместо His и Gln Asn и Thr, соответственно, а в положениях 49 и 52 субъединицы HA2 вместо Thr и Val Asn и Leu, соответственно. Анализ аминокислотных последовательностей гемагглютининов вирусов гриппа штаммов A/USSR/90/77 (H1N1), A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), A/duck/Novosibirsk/56/2005 (H5N1), а также и A/Aichi/2/68 (H3N2), использованных в работе, показал, что указанные эпитопы гемагглютининов вирусов подтипов H1 и H5 имеют высокую степень гомологии. Только у штамма A/duck/Novosibirsk/56/2005 (H5N1) существует одна замена (в положении 40 Gln заменен на Val) (рис. 7). Тогда как у штамма A/Aichi/2/68 (H3N2) в данном эпитопе имеются существенные отличия от эпитопа, общего для вирусов гриппа первого клайда.

Было показано, что двукратная интраназальная иммунизация мышей аденовирусом Ad-NA5-2 приводит к индукции образования у них антител, специфичных к вирусу гриппа A/USSR/90/77 (H1N1). Уровень антител, препятствующих агглютинации эритроцитов вирусом гриппа H1N1 в сыворотках иммунизированных мышей, был достоверно отличен от уровня в сыворотке крови контрольных животных. При этом разница между уровнем антител в РТГА к вирусу гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в сыворотках крови иммунизированных мышей и уровнем неспецифического торможения гемагглютинации за счет компонентов сыворотки крови мышей была статистически не достоверна.

Для проверки протективных свойств рекомбинантного аденовируса Ad-NA5-2 против летальных доз (10 LD<sub>50</sub>) вирусов гриппа A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2) была проведена интраназальная двукратная иммунизация мышей. Показано, что иммунизация рекомбинантным аденовирусом позволила получить 100 % защиты против 10 LD<sub>50</sub> вируса гриппа A/USSR/90/77 (H1N1) и, напротив, защитила только 20 % мышей от 10 LD<sub>50</sub> вируса A/Aichi/2/68 (H3N2), что, скорее всего, произошло за счет вклада в защиту мышей неспецифического противовирусного иммунного ответа на введение в организм аденовирусного вектора.

## ВЫВОДЫ

В результате проведенной работы впервые было показано, что доставка гена гемагглютинина вируса гриппа в составе аденовирусного вектора в клетки животных индуцирует протективный гетеросубтипический перекрестный иммунный ответ не только против вирусов гриппа внутри одного подтипа, но и против вирусов гриппа разных подтипов, относящихся к одному клайду.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что аденовирусные векторы могут служить универсальной платформой для получения вакцин как от сезонных, так и от пандемических штаммов вируса гриппа. ●

*Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (частично использованы средства по ГК № 02.512.11.2320). Выражаем глубокую благодарность академику РАМН Каверину Н.В. за постоянный интерес к работе, критические замечания и помощь в подготовке публикации.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Benihoud K., Yeh P., Perricaudet M. // Curr. Opin. Biotechnol. 1999. V.10(5). P. 440–7.
2. Bett A.J., Prevec L.A., Graham F.L., et al. // J. Virol. 1983. V. 67. P. 5911–5921.
3. Hoelscher M.A., Singh N., Garg S. // J. Infect. Dis. 2008. V. 197(8). P. 1185–1188.
4. Kashyap A.K., Steel J., Oner A.F., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 22;105(16). P. 5986–91.
5. Корецкы-Бромберг S.A., Palese P. // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2009. V. 333. P. 243–67.
6. Lvov D.K. // Sov. Med. Rev. E. Virol. Rev. 1987. V. 2. P. 15–37.
7. Melidou A., Gioula G., Exindari M., Chatzidimitriou D., Diza-Mataftsi E. // Eurosurveillance. 2009. V. 14. Issue 20.
8. Shinde V., Bridges C.B., Uyeki T.M. // The new England journal of medicine. 2009. V. 360;25. P. 2616–2625.
9. Smirnov Y.A., Lipatov A.S., Van Beek R., et al. // Acta Virol. 2000. V. 44(1). P. 1–8.
10. Smirnov Y.A., Lipatov A.S., Gitelman A.K., Claas E.C., Osterhaus A.D. // Arch. Virol. 2000. V. 145(8). P. 1733–41.
11. Srivastava I.K., Margaret A.L. // Ann. Inten Med. 2003. V. 138. P. 550–559.
12. Sui J., Hwang W.C., Perez S., et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. V. 16(3). P. 265–73.
13. Tang D.C., Zhang J., Toro H., Shi Z., Van Kampen K.R. // Expert Rev. Vaccines. 2009. V. 8(4). P. 469–81.
14. Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., et al. // PLoS ONE. 2008. V. 3(12). Issue 12. P. 942.
15. Toro H., Tang D.C., Suarez D.L., Shi Z. // Vaccine. 2008. V. 26(21). P. 2640–2646.
16. Van Kampen K.R., Shi Z., Gao P., et al. // Vaccine. 2005. V. 23(8). P. 1029–36.
17. Webster R.G., Bean W.J., German O.T., et al. // Microbiol. Rev. 1992. V. 56. P. 152–179.
18. Луговцева В.Ю., Васильева Д.А. // Классификация и номенклатура вирусов зооночных. Ульяновск. 2002. 268с.
19. Кочергин-Никитский К.С. // Анализ взаимодействия генов при скрещивании низкопатогенного вируса гриппа птиц подтипа H5 и высокопродуктивного штамма вируса гриппа человека. М., ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. 2007.
20. Львов Д.К., Забережный А.Д., Алипер Т.И. // Природа. 2006. № 6.
21. Степанова Л.А., Мигунов А.И., Коротков А.В., Кузнецов О.К. // Медицинский академический журнал. 2006. Т. 6. № 4. С. 3–16.

# Акция! Один номер бесплатно

Самоорганизующиеся структуры и  
наносборки

Наноэлектроника

Устройства и изделия на  
основе наноматериалов  
и нанотехнологии

Исследования  
наноуглерода

## Подписка в редакции:

Телефон/ факс:

+7 (495) 930 88 06

E-mail: [podpiska@nanorf.ru](mailto:podpiska@nanorf.ru)

Web-site: [www.nanorf.ru](http://www.nanorf.ru)

Каталоги Роспечати (индекс 59880)  
и «Пресса России» (индекс 42368)

[www.nanorf.ru](http://www.nanorf.ru)

Российские нанотехнологии –  
ведущий\* научный журнал

\* по данным расчёта импакт-фактора за 2008 год (elibrary.ru, данные ИФ РИНЦ от 16.06.2009 г.)



# Правила для авторов

## ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал «Acta Naturae» публикует экспериментальные и обзорные статьи, а также проблемные 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.

Редакция журнала «Acta Naturae» просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, оформленные без соблюдения этих правил, возвращаются авторам без рассмотрения.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы 60 000 знаков (примерно 40 стр., 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 стр. формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10. Статьи большого 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 стр. формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать четырех.

Рукопись следует оформить набором файлов – текст, реферат, список цитируемой литературы, подписи к рисункам, таблицы – в формате Microsoft Word 2003 for Windows, рисунки в формате JPG или TIF, каждый рисунок оформляется отдельным файлом.

Рукопись направляется в редакцию в виде электронной версии. В качестве электронных носителей могут использоваться CD-ROM.

## ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

УДК в левом верхнем углу, размер 9.

Название статьи. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы.

Инициалы и фамилии авторов. Автор, ответственный за переписку с редакцией, включая работу с корректурой, выделяется сноской, внизу первой страницы рукописи приводится электронный адрес для переписки.

Полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность.

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.

Ключевые слова. В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.

Список сокращений.

Заглавие статьи на английском языке.

Фамилии и инициалы авторов в английской транскрипции с пометками, указывающими на организацию, в которой работают авторы.

Полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность на английском языке.

Введение.

Раздел «Экспериментальная часть».

Раздел «Результаты и обсуждения».

Раздел «Выводы». В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.

Раздел «Список литературы». Ссылки в тексте на цитируемую литературу даются в квадратных скобках, например [1].

Реферат на английском языке, являющийся переводом аннотации (резюме) на русском языке.

## 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.

Во всем тексте, кроме даты поступления, все даты в виде «число.месяц.год», набираются следующим образом: 02.05.1991, 26.12.1874 и т.п.

Точка не ставится после: «УДК» – Заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).

Точка ставится после: сноска (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления) (но не ставится в подстрочных индексах:  $T_{\text{пл}}$  – температура плавления,  $T_{\text{ф.п}}$  – температура фазового перехода). Исключение: млн – миллион – без точки.

Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).

Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не  $\mu\text{M}$ ; мм, но не  $\text{mm}$ ).

Знак «-» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал», или «химическая связь» пробелами не отбиваются.

В качестве знака умножения используется только «X». Знак «X» ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом «x» обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК-РНК и т.п.)

Используются только «кавычки», но не "кавычки". Числовой материал представляется в виде таблиц.

В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.

Латинские названия родов и видов живого мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга – прямым шрифтом. Названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции пишутся прямым текстом. Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.

Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (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.

Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутонных изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций

Недопустимо сохранение в файлах неиспользуемых путей отбровок и дополнительных каналов (Path и Alpha Channel), также недопустимо использование дополнительных слов.

Форматы файлов – Adobe Photoshop до 7.0. включительно TIFF, JPG.

## 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, ответственные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и при необходимости 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.

Решением редакционной коллегии статья может быть отклонена, если она не удовлетворяет перечисленным выше требованиям.

Рукопись, направленная автором 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.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукописи вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с первоначальным экземпляром статьи, а также ответами на все замечания. Датой поступления считается день получения редакцией окончательного варианта статьи.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая.

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.

После сдачи очередного выпуска журнала на макетирование редакция рассылает авторам по электронной почте корректуры статей в виде PDF файла.

На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается редколлегией.

## ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

В журнале используется последовательная нумерационная система цитирования, т.е. по ходу изложения указывается порядковый номер процитированного источника (в квадратных скобках), соответствующий номеру в списке литературы.

Для книг: фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Для периодических изданий: фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Bressanelli S., Tomei L., Roussel A., et al // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 13034–13039 (если авторов больше пяти). Если авторов меньше пяти, указываются все авторы.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

Ссылки на авторефераты диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Ссылки на патенты должны содержать фамилию и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента. Список литературы печатается на отдельной странице.

Таблицы печатаются на отдельной странице. Подписи к рисункам печатаются на отдельной странице.

Для связи с редакцией следует использовать следующие электронные адреса: rpefrov@strf.ru, vera.knorre@gmail.com, vsychev@strf.ru, тел.: (495) 727-38-60, (495) 930-80-05