ISSN 1999-9127

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ"

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 7

Выходит два раза в год
Издается с 2005 г.

Минск 2008

Национальная академия наук Беларуси

ISSN 1999-9127

Государственное научное учреждение
**«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 7

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2008

Национальная академия наук Беларуси

УДК [577.21 + 575] (082)

Издание осуществлено при финансовой поддержке
Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований.

Редакционная коллегия:
А.В. Кильчевский — главный редактор, Л.В. Хотылева — зам. главного редактора;
К.У. Вильчук, С.И. Гриб, О.Г. Давыденко, А.Н. Евтушенков, А.П. Ермишин, М.А. Кадыров, Н.А. Картель, А.И. Ковалевич, Г.И. Лазюк, В.А. Лемеш, С.А.Лихачев, Н.П. Максимова, С.Б. Мельнов, М.Е. Михайлова, И.Б. Моссэ, М.Е. Никифоров, В.Е. Падутов, В.Н. Решетников, Е.А. Сычева, В.В. Титок, И.П. Шейко, О.Н. Харкевич – члены редколлегии;
И.В. Широкая — ответственный секретарь.

Рецензенты:
О.Г. Давыденко, д.б.н., чл.-корр., ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»;
И.Б. Моссэ, д.б.н., проф., ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»;
Г.И. Лазюк, чл.-корр. РАМН и НАН Беларуси, д.м.н., гл. научн. сотр. БГМУ

М75 **Молекулярная и прикладная генетика**: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редколл.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. — Минск: Право и экономика, 2008. — 180 с. — ISBN 978-985-442-581-8.

В сборнике научных трудов публикуются обзорные и экспериментальные статьи в области молекулярной и прикладной генетики растений, микроорганизмов, животных, человека, отражающие исследования генетических процессов на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Особое внимание уделяется наиболее актуальным проблемам геномики, генетической и клеточной инженерии. Публикуются результаты изучения генетических основ селекции растений, животных и микроорганизмов, разработки эффективных биотехнологий для сельского хозяйства, здравоохранения, охраны окружающей среды, биобезопасности.

Сборник предназначен для специалистов, работающих в области генетики, преподавателей, аспирантов и студентов ВУЗов биологического, сельскохозяйственного и медицинского профиля.

Текущий выпуск сборника посвящен вопросам молекулярной медицины, в частности, проблеме возникновения, диагностики и лечения различных заболеваний; ряд статей содержит обширный исследовательский материал по проблемам канцерогенеза, геномной нестабильности и разработке новых фармакологических препаратов.

УДК [577.21 + 575] (082)
ISSN 1999-9127

ISBN 978-985-442-581-8

© ГНУ «Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси», 2008

Национальная академия наук Беларуси

ОГЛАВЛЕНИЕ

В.А. Галаган, Ю.А. Щербак, М.А. Цыганкова, Н.Н. Руденко, И.Н. Емец, В.В. Куракова, Ш.А. Кульбалаева, Р.В. Калашникова, А.К. Куркевич
Молекулярно-цитогенетические методы в диагностике синдромальных форм врожденных пороков сердца 7

В.М. Шкуматов
Трансгенные микроорганизмы для фармакологических исследований 12

О.В. Квитко, Я.И. Шейко, И.И. Конева, С.Е. Дромашко
Разработка клеточных тест-систем для создания полинуклеотидных антираковых препаратов 18

Т.Д. Кужир
Некоторые аспекты прогноза, профилактики и лечения рака с учетом роли репарации ДНК в канцерогенезе (обзор) 25

К.А. Фроленков, Н.С. Фролова, Е.В. Рудая, В.М. Шкуматов
Влияние тетразолов на взаимоотношение 17α-гидроксилазной и 20(α, β)-гидроксистероид-дегидрогеназной активностей в рекомбинантных дрожжах, трансформирующих стероиды 41

Я.В. Фалетров, Н.С. Фролова, Е.В. Рудая, В.Г. Радюк, В.М. Шкуматов
Подавление 3β-О-ацетилирование прегненолона и его производных в рекомбинантных дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/YE$_p$5117α алифатическими спиртами 45

О.В. Даливеля, Н.В. Савина, Т.Д. Кужир, И. Бурачевска, М. Воеводска
Жизнеспособность и пролиферация клеток млекопитающих под влиянием антимутагена дигидропиридинового ряда 49

Е.А. Аксенова, Т.Н. Покладок, В.Г. Объедков, Н.Г. Даниленко
Оценка соотношений генотипов матери и ребенка по генам резус фактора в семьях больных шизофренией 55

Т.С. Зимовина
Мутации и полиморфные аллели гена арилсульфатазы А при метахроматической лейкодистрофии 59

Т.В. Демидович .....
Полиморфизм промотора гена УДФГТ1А1 у белорусских пациентов с синдромом Жильбера 65

О.Д. Левданский, Н.Г. Даниленко, О.Г. Давыденко
Частоты полиморфных аллелей гена фактора некроза опухолей альфа (TNFα) у белорусов 71

А.Л. Гончар, И.Б. Моссэ, Д.В. Савчин
Молекулярно-генетический анализ полиморфизмов Thr312Ala и Val34Leu как факторов риска инфаркта миокарда 75

П.М. Морозик, И.Б. Моссэ
Роль гормона мелатонина в регуляции межклеточной передачи информации 80

Национальная академия наук Беларуси

Р.И. Гончарова, Т.Д. Кужир, Н.В. Савина, М.П. Смаль
Индуцированная геномная нестабильность как фактор заболеваемости. Оценка целостности генома человека методом ДНК-комет 86

О.А. Скугаревский, Н.Г. Даниленко
Фенотипическая реализация полиморфизма гена нейротропного фактора мозга (BDNF) при нарушениях пищевого поведения 93

Е.П. Михаленко, Н.Н.Чакова, С.Н. Полонецкая, Н.В.Чеботарева, С.Е. Дромашко, Э.В. Крупнова
Полиморфизм некоторых генов биотрансформации ксенобиотиков и их влияние на предрасположенность к мультифакториальной патологии 100

Н.И. Рябоконь, Н.В. Никитченко, О.В. Даливеля, Р.И. Гончарова
Результаты исследований генопротекторной активности одного из перспективных производных 1,4-дигидропиридина с использованием клеток человека *in vitro* 105

С.А. Лихачев, И.В. Плешко
Организация диагностики и лечения наследственных неврологических болезней: основные проблемы современного этапа 110

Л.Н. Сивицкая, Е.И. Кушнеревич, Н.Г. Даниленко, О.Г. Давыденко
Исследование генетических факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний в Беларуси 115

О.А. Якуц, К.А. Моссэ, И.В. Плешко
Торсионные дистонии: классификация, клинические проявления, молекулярно-генетическая природа и диагностика 123

Н.И. Моссэ, К.А. Моссэ
Аллельные варианты политимидинового тракта гена и их роль в нарушении репродуктивной функции у мужчин 128

Ю.В. Цукерман, К.А. Моссэ
Мутации гена ФАГ у белорусских пациентов с фенилкетонурией 133

О.Н. Гриценко
Роль генетических дефектов системы комплемента в развитии гемолитико-уремического синдрома 137

Я.И. Шейко, О.В. Квитко, И.И. Конева, С.Е. Дромашко
Исследование роли аномальных митозов в процессе раковой трансформации 143

С.Б. Мельнов, Ю.В. Малиновская
Молекулярно-генетические механизмы формирования геномной нестабильности при низкодозовых воздействиях у человека (обзор) 148

К.А. Архипова, А.Н. Тележкина, И.Б. Зборовская
Роль кавеолина-1 в канцерогенезе (обзор) 157

Рефераты 169

Правила оформления статьи 180

Национальная академия наук Беларуси

CONTENTS

V. Galagan, U. Shcherbak, M. Tsygankova, N. Rudenko, I. Emec, V. Kurakova, Sh. Kulbalaeva, R. Kalashnikova, A. Kurkevich
Molecular-cytogenetic methods used in diagnostics of syndromic forms of diseases 7

V. Shkumatov
Transgenic microorganisms for pharmacological investigation 12

O. Kvitko, Y. Sheiko, I. Koneva, S. Dromashko
Elaboration of cell test systems for creation of polynucleotide anticancer drugs 18

T. Kuzhir
Some aspects of cancer prognosis, prevention and treatment taking into consideration the role of DNA repair in tumorogenesis (Review) 25

K. Fralenkov, N. Frolova, E. Rudaya, V. Shkumatov
Tetrazole influence on the relationship between 17α-hydroxylation and 20(α,β)-hydroxysteroid-dehydrogenation in the recombinant yeast transforming steroids... 41

Y. Faletrov, N. Frolova, E. Rudaya, V. Radjuk, V. Shkumatov
Decrease of pregnenolone and related steroids 3β-O-acetylation in recombinant yeasts *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/YEp5117α by aliphatic alcohols 45

O. Dalivelya, N. Savina, T. Kuzhir, I. Buraczewska, M. Wojewodzka
Viability and proliferation of mammalian cells affected by an antimutagen of dihydropyridine series 49

E. Aksyonova, T. Pokladok, V. Obyedkov, N. Danilenko
The role of maternal-fetal genotype incompatibility at the RHD locus in schizophrenia: family-based study 55

T. Zimovina
Mutations and pseudodeficiency alleles of the ASA gene in patients with metachromatic leukodystrophy 59

T. Dzemidovich
Promotor UGT1A1 polymorthisms in Belorussian patients with Gilbert syndrome 65

O. Levdanski, N. Danilenko, O. Davydenko
Frequencies of polymorphic alleles of the tumor necrosis factor alpha (TNFα) gene in Belorussians 71

A. Gonchar, I. Mosse, D. Savchin
Molecular-genetical analysis of Thr312Ala and Val34Leu polymorphisms as risk factors of myocardial infraction 75

P. Marozik, I. Mosse
The role of hormone melatonin in regulation of intercellular transfer of information 80

Национальная академия наук Беларуси

R. Goncharova, T. Kuzhir, N. Savina, M. Smal
Induced genome instability as a morbidity factor. Evaluation of genome integrity by comet assay. 86

O. Skugarevsky, N. Danilenko.....
Phenotypic realization of BDNF-gene polymorphism in eating behavior disorders..... 93

E. Mikhalenko, N. Chakova, S. Polonetskaya, N. Chebotareva, S. Dromashko, E. Krupnova
Polymorphism of some biotransformation genes of xenobiotics and their influence on predisposition to multifactorial pathology..... 100

N. Ryabokon, N. Nikitchenko, O. Dalivelya, R. Goncharova
Results of studies on genoprotective activity of a promising compound of 1,4-dihydropyridine derivatives in human cells *in vitro*..... 105

S. Likhachev, I. Pleshko
Organization of diagnostics and treatment of hereditary neurologic diseases: basic problems of present stage..... 110

L. Sivitskaya, A. Kushnerevich, N. Danilenko, O. Davydenko
Study of genetic risk factors of cardiovascular diseases in Belarus..... 115

V. Yakuts, K. Mosse, I. Pleshko
Torsion dystonia: classification, clinical manifestation, molecular-genetic nature and diagnostics 123

N. Mosse, K. Mosse
The poly-t tract allelic variants in intron 8 of the CFTR gene and their role in male infertility 128

J. Tsukerman, K. Mosse
Mutations of PAH gene in Byelorussian patients with PKU..... 133

O. Gritsenko
Genetic abnormalities in the complement system in pathogenesis of hemolytic-uremic syndrome..... 137

Y. Sheiko, I. Koneva, O. Kvitko, S. Dromashko
Study of the anomalous mitosis involvement in cancer transformation..... 143

S. Melnov,Yu. Malinovskaya
Molecular mechanisms of genomic instability for humans affected by low dose irradiation.... 148

K. Arkhipova
The role of cabeolin-1 in carcinogenesis..... 157

Summaries 169

Instructions to authors 180

Национальная академия наук Беларуси

УДК 575.116.4:314.33

В.А. Галаган, Ю.А. Щербак, М.А. Цыганкова, Н.Н. Руденко, И.Н. Емец, В.В. Куракова, Ш.А. Кульбалаева, Р.В. Калашникова, А.К. Куркевич

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ СИНДРОМАЛЬНЫХ ФОРМ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА

Медико-генетический центр УДСБ «ОХМАТДЕТ» МЗ Украины
Украина, г. Киев, 01135, Чорновола, 28/1
Научно-практический центр детской кардиологии и кардиохирургии МЗ Украины
Украина, г. Киев, 01135, Чорновола, 28/1

Введение

Врожденные пороки сердца (ВПС) — одна из наиболее распространенных аномалий у детей, которая на сегодня остается серьезной проблемой в медико-социальном, экономическом и этическом плане. По данным реестров EUROCAT частота ВПС находится в пределах 59—60 случаев на 10 тысяч живорожденных, в т.ч. случаев фетальной смерти после 20 недель гестации, а также плодов, абортированных после пренатальной диагностики [1]. В Украине ВПС являются одними из самых распространенных пороков развития (7—12 случаев на 1000 новорожденных) и вызывают около 40 % перинатальных потерь [2]. По данным собственных исследований частота изолированных ВПС среди новорожденных в г. Киев за период 1999-2002 гг. составила 75 случаев на 10 тысяч выходов беременностей, а удельный вес пороков сердца у новорожденных с множественными пороками и синдромом Дауна составил примерно третью часть (32,76 на 38,14 % соответственно), что говорит о необходимости проведения медико-генетического консультирования всех детей с изолированными ВПС и синдромальными формами [3].

Среди этиологических факторов ВПС могут быть как генные, так и хромосомные мутации (количественные и качественные перестройки). При этом отмечается некоторая специфичность ассоциации определенных генетических синдромов с соответствующими ВПС [4]. Примером могут служить такие хромосомные синдромы, как синдром микроделеции 22q11.2 и синдром Вильямса. Первый объединяет гетерогенную группу заболеваний и впервые был описан Ди Джорджи в 1965 году с такими признаками, как гипопаратиреоз, аплазия тимуса, ВПС. Порок сердца при синдроме 22q11 встречается приблизительно у 75-80 % случаев в виде так называемых конотрункальных аномалий — тетрады Фалло (ТФ) — 20 %, полного перерыва дуги аорты (ПДА) — 15 %, общего артериального протока (ОАП) — 9 %, дефекта межжелудочковой перегородки (ДМЖП) в сочетании с атрезией легочной артерии (АЛА) — 10 % [5]. У всех детей с клиническим диагнозом синдрома Вильямса отмечалось специфическое лицо и ВПС (надклапанный стеноз легочной артерии).

Учитывая имеющиеся сложные комбинированные пороки сердца у детей с микроделеционными синдромами, которые являются основной причиной смерти детей на первом году жизни, своевременная кардиохирургическая помощь в комплексе с интенсивной медицинской помощью является залогом эффективного лечения в специализированном медицинском учреждении.

На сегодняшний день в Украине возможно проведение подтверждающей лабораторной диагностики микроделеционных синдромов, в т.ч. синдрома 22q11.2 и синдрома Вильямса, с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) при условии наличия ДНК-зондов. Следует отметить, что частота синдрома микроделеции 22q11.2 (MIM: 188400) составляет 1:4000 новорожденных, и ранняя его диагностика будет способствовать своевременному адекватному лечению и повыше-

Национальная академия наук Беларуси

нию эффективности медико-генетического консультирования семьи. Частота синдрома Вильямса (MIM: 194050) составляет 1:20000 новорожденных.

Цель работы: проведение комплексного клинико-цитогенетического обследования детей с подозрением на синдромы Вильямса и микроделеции 22q11.2.

Задачи исследования:

— анализ данных акушерского анамнеза и пренатальной эхокардиографии обследованной группы детей с подозрением на вышеизложенные синдромы;

— оценка характеристик фенотипа пробанда;

— оценка полученных лабораторных цитогенетических данных.

Материалы и методы

Работа проведена на базе МГЦ УДСБ «ОХМАТДЕТ» МЗ Украины и Научно-практического медицинского центра детской кардиологии и кардиохирургии МЗ Украины в 2007-2008 гг. Медико-генетическое консультирование и цитогенетическое обследование проведено у 13 детей с ВПС и клиническими признаками микроделеционного синдрома 22q11.2 и у 9 детей с фенотипом синдрома Вильямса. Дети в МГЦ были направлены кардиологами, как с поликлинического отделения, так и с отделения интенсивной терапии кардиохирургического центра после проведения ультразвукового обследования сердца (УЗО). Следует отметить последовательность консультирования пробандов:

— консультация и обследование больного кардиологом специализированного учреждения с целью уточнения ВПС;

— медико-генетическое консультирование в МГЦ (первичное);

— проведение молекулярно-цитогенетического исследования пробандов с последующим генетическим консультированием.

УЗО детей проводилось на аппаратах Sonos 5500 і 7500 (Philips).

Медико-генетическое консультирование проводилось врачом-генетиком с заполнением регистрационной карты семьи, которая содержит данные акушерско-гинекологического анамнеза, генеалогического анализа, описание фенотипа, результаты инструментальных и лабораторных исследований.

Цитогенетические и молекулярно-цитогенетические обследования выполнялись в лаборатории медицинской генетики МГЦ. Анализ кариотипа делали согласно со стандартной методикой [7]. Для проведения цитогенетического исследования использовались лимфоциты периферической крови пациента: 0,5 мл цельной крови культивировались в одноразовых флаконах на питательной среде «PBmax».

Для анализа препаратов была использована G-методика дифференциального окрашивания хромосом красителем Гимза.

Процедура флуоресцентной *in situ* гибридизации на интерфазных ядрах и метафазных пластинках была проведена по методу Pinkel с некоторыми модификациями [8, 9]. В работе были использованы прямые сайт-специфические ДНК-зонды (Vysis, Germany), один из которых метит участок 22q11.2, локус N25 в случае синдрома микроделеции 22q11.2, а другой — участок 7q11.23, локус ELN в случае синдрома Вильямса (Рис. 1, Рис. 2).

Технология гибридизации включала в себя следующие этапы:

— предобработка препаратов путем дегидратации в спиртах (70°С, 80°С, 96,6°С);

— совместная денатурация препаратов хромосом и ДНК-проб;

— гибридизация препаратов (16-18 часов);

— поэтапная отмывка препаратов и подготовка к анализу.

Анализ проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse E600 при увеличении ×10иі ×100.

Национальная академия наук Беларуси

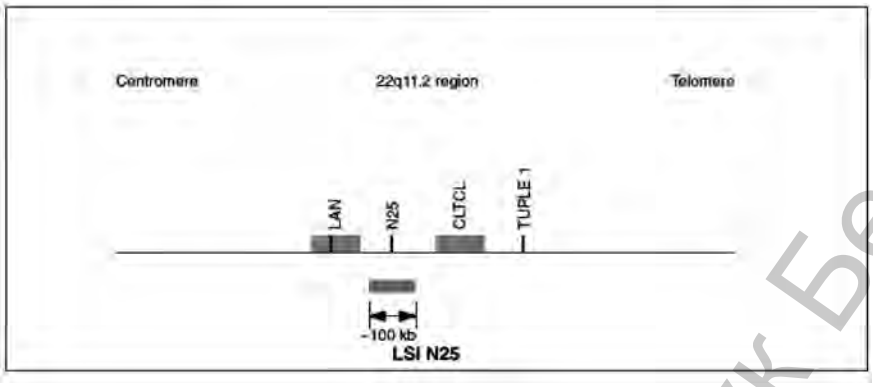


Рис. 1. Схематическое изображение локуса N25 на длинном плече 22 хромосомы, к которому комплементарен сайт-специфический ДНК зонд — LSI N25 SpectrumOrange/ARSA SpectrumGreen.

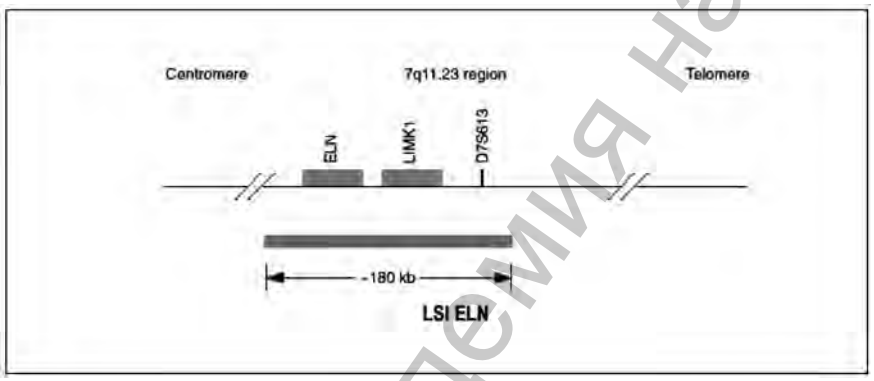


Рис. 2. Схематическое изображение локуса ELN на длинном плече 7 хромосомы, к которому комплементарен сайт-специфический ДНК зонд — LSI ELN SpectrumOrange/LSI D7S485, D7S52 SpectrumGreen.

Результаты и обсуждение

При проведении медико-генетического консультирования важно отметить, относилась ли семья пробанда к группе повышенного риска относительно появления врожденных пороков развития у ребенка. Анализ возрастной характеристики родителей больных детей показал, что в 82 % случаев возраст матери пробанда был до 35 лет, а возраст отца — до 45 лет (91 %). По данным других авторов врожденные пороки развития у детей могут возникать у родителей разной возрастной категории. Результаты исследований показали, что в половине случаев (55 %) в анамнезе наблюдалась угроза выкидыша на ранних сроках беременности (5—12 недель), что было показанием к проведению медико-генетического консультирования и пренатального генетического скрининга для исключения врожденной и хромосомной патологии. Только в трех случаях во время беременности была проведена генетическая консультация без пренатального биохимического скрининга, который может быть информативным для диагностики некоторых врожденных пороков плода, в т.ч. ВПС.

Во время беременности большинство женщин трижды (91 % случаев) прошли эхокардиографическое обследование плода на разных сроках беременности, начиная с 5—6 недели. В трех случаях количество УЗО плода было проведено более трех раз, но диагноз ВПС пренатально был поставлен только в 14 % случаев при сроке после 26 недель гестации. Приведенные данные созвучны с предыдущими собственными исследованиями и указывают на сложность пренатальной диагностики ВПС и необходимость таких исследований в специализированных медицинских центрах.

Национальная академия наук Беларуси

Что касается акушерского анамнеза, следует отметить, что большинство (90 %) пробандов родились своевременно (38-40 недель), роды протекали без осложнений (98 %), вес тела при рождении составлял 3000 г и больше (82 %).

В исследуемую группу были включены дети разного возраста: до 1 года — 35 %, 1-2 года — 48 %, старше 2 лет — 17 %, которые имели клинические проявления микроделеционных синдромов.

Поскольку для установления диагноза синдрома микроделеции 22q11.2 считается достаточным наличие одного — двух признаков основной группы клинических проявлений синдрома (ВПС, гипоаплазия тимуса, гипопаратиреоз, лицевые дисморфии, расщелина неба или велофарингеальная недостаточность) [6], цитогенетические исследования проводили у детей, имеющих не менее двух основных клинических признаков синдрома.

Анализ фенотипа показал, что в 100 % случаев пробанды имели лицевые дисморфии и ВПС в виде конотрункальных пороков. УЗО тимуса показало наличие его гипоаплазии в 27 % случаев. Следует отметить, что у всех детей, у которых диагноз был подтвержден лабораторно, наблюдалась гипоаплазия тимуса. У двух из 11 детей в неонатальном периоде отмечалась гипокальцемия, которая не сопровождалась судорогами. В одном случае, кроме ВПС и лицевых дисморфий у ребенка наблюдалась расщелина неба.

Анализируя данные клинического обследования, следует отметить, что все обследованные пациенты имели не менее двух признаков из группы пяти основных, что было показанием для проведения цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследований.

Лабораторное обследование проводилось в два этапа: I этап — определение кариотипа по общепринятой методике с использованием дифференциального окрашивания [7], II этап — проведение молекулярно-цитогенетического исследования [8].

Из 11 обследованных пробандов у четырех была выявлена микроделеция по длинному плечу хромосомы 22. Запись кариотипа — 46, XX. ish del (22)(q11.2)(N25-). У всех детей с синдромом Вильямса выявлена соответствующая микроделеция — кариотип: 46, XX. ish del (7)(q11.23)(ELN-).

Отсутствие микроделеции по длинному плечу хромосомы 22 у остальных 8 пробандов не означает отсутствия микроделеционного синдрома хромосомы 22. Согласно полученным лабораторным данным можно сделать вывод, что делеция 22q11.2 не всегда является причиной клинических проявлений синдрома. Возможно также присутствие атипичных делеций, которые проявляются подобным фенотипом. Это могут быть как другие микроперестройки на хромосоме 22, так и перестройки других хромосом, например, делеция хромосомы 10p13 [6]. Перспективой дальнейшего исследования является использование в диагностике ДНК-проб на другом локусе в сегменте 22q11.2.

Заключение

По результатам исследования установлено, что дети с микроделеционными синдромами родились от матерей с нормально протекающей беременностью и срочных родов (90 %), с весом 3000 г и больше (82 %).

Эхокардиографию плода с целью исключения конотрункального ВПС целесообразно проводить с участием врачей УЗД специализированных центров (медико-генетический, кардиологический).

Для подтверждающей диагностики микроделеционного синдрома 22q11 целесообразно использовать несколько ДНК-проб на сегмент 22q11.

Национальная академия наук Беларуси

Список использованных источников

1. EUROCAT Report and Surveillance of Congenital Anomalies in Europe, 1980-1999 / Ed. by EUROCAT Working GrouP. // Northen Ireland: University of Ulster. — 2000. — 280 p.

2. Макацария, А.Д. Медико-генетическое консультирование женщин с сердечно-сосудистыми заболеваниями / А.Д. Макацария, Ю.Н. Беленкова, А.Л. Бейлина // Беременность и врождённые пороки развития. — 2001. — С. 101—115.

3. Галаган, В.О. Медико-генетичне консультування новонароджених з уродженими вадами серцево-судинної системи: популяційна частота, чинники ризику їх виникнення / В.О. Галаган, [та інш.] // Медичні перспективи. — 2003. — Т. VIII, № 4. — С. 85—89.

4. Мутафьян, О.А. Врождённые пороки сердца у детей. — М., 2002. — 330 с.

5. For resources and information on Mlm software and Digeorge syndrome / [Electronic resource]. — 2008. — Mode access: htpp://www.digeorge.com. — Date access: 04.01.2008.

6. Городенко, Н.Г. Синдром мікроделеції 22q11.2: клініка, діагностика, особливості лікування, медико-генетичне консультування / Н.Г. Городенко [та інш.] // К., 2005. — 19 с.

7. Зерова-Любимова, Т.Е. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини / Т.Е. Зерова-Любимова, Н.Г. Горовенко. — Київ, 2003. — 23 с.

8. Pincel, D. Cytogenetic Analysis Using Quantitative, High Sensitivity Fluorescence Hybridization / D. Pincel, T. Straume, J.W. Gray. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA . — 1986. — Vol. 83 — P. 2934—2938.

9. Ворсанова, С.Г. Медицинская цитогенетика / С.Г. Ворсанова, Ю.Б. Юров, В.Н. Чернишов. — М.: Практика, 2006. — 300 с.

Дата поступления статьи 4 апреля 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 577.175.5

В.М. Шкуматов

ТРАНСГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

НИИ физико-химических проблем, Белорусский государственный университет
Республика Беларусь, 220050, г. Минск, ул. Ленинградская, 14

Введение

Разработка лекарственных средств включает поиск новых фармакологически активных веществ или новых комбинаций фармакологически активных веществ, последующее изучение их свойств, а также разработку технологии промышленного производства и методов контроля за качеством лекарственных средств. В целях изучения эффективности и безопасности лекарственных средств проводятся химические, физические, биологические, микробиологические, фармакологические, токсикологические и иные доклинические исследования, не предусматривающие исследований на физических лицах [1]. Как было процитировано выше, порядок разработки лекарств обязан носить элементы здравого консерватизма, поэтому применение новых подходов в этой области требует разностороннего исследования. На современном уровне процесс разработки новых лекарств начинается с идентификации белка (продукта экспрессии гена), ответственного за появление или развитие болезни. Задачей следующей стадии является идентификация лиганда (ингибитора, активатора, модификатора), обладающего, в частности, минимальной энергией связывания с этим белком. Даже самые передовые методы, основанные на эмпирических моделях, часто ведут к неустранимым погрешностям, и превращают разработку целевого лекарства в тупиковый путь.

В связи с общей тенденцией гуманизации медико-биологических исследований, использование систем гетерологической экспрессии ферментов или ферментных систем млекопитающих в клетках микроорганизмов можно рассматривать как новое перспективное направление, позволяющее использовать в фармакологических исследованиях подходы метаболической протеомики. В последнее время широко исследуется полиморфизм гена *CYP17*, и его связь с риском развития рака. Установлено, что аллель А2 гена *CYP17* имеет повышенную скорость транскрипции, что выражается в увеличении образования андрогенов и эстрогенов и может привести к развитию синдрома поликистозных яичников, рака простаты и молочной железы. Терапия рака предстательной железы предполагает использование препаратов, понижающих биосинтез половых гормонов — антиандрогенов, большинство из которых является ингибиторами Р450с17. Поэтому новые тест-системы для проверки эффективности действия ингибиторов Р450с17 являются важным элементом для разработки новых лекарственных препаратов. В настоящей работе будет продемонстрировано развитие нового подхода — системы гетерологической экспрессии ферментов стероидогенеза, увенчавшегося созданием метаболического аналога надпочечной железы в клетках микроорганизмов.

Материалы и методы

При выполнении настоящей работы использована методология структурной биологии, биоорганической химии, биохимии, генетической инженерии, биотехнологии. Для исследования «молекулярного узнавания» в монооксигеназных системах были изолированы более 20 гомогенных белков млекопитающих и микроорганизмов, проведена их структурно-функциональная характеристика, осуществлена иммобилизация электронтран-

Национальная академия наук Беларуси

спортных белков и аналогов субстратов через различные функциональные и пространственные группы. Гомологичная и гетерологичная реконструкция мультиферментных систем *in vitro* осуществлялась под контролем физико-химических и функциональных методов: тандемной спектроскопии вторых производных в видимой и УФ-областях, импульсного фотолиза, остановленного потока, радиохроматографии, ковалентно-сорбционной реконструкции. При поиске потенциальных микроорганизмов-реципиентов исследовали биотрансформирующую активность по отношению к стероидам следующих микроорганизмов *in vivo*: *Aspergillus ochraceus*, *Saccharomices cerevisiae*, *Candida maltosa*, *Yarrowia lipolytica* и их субклеточных структур. Для гетерологичной экспрессии ферментов млекопитающих сконструировали и применяли *S. cerevisiae* GRF 18/YEp5117α (встроенный ген для P450c17 под контролем промотора *GAL10*), различные трансформанты *Y. lipolytica*, экспрессирующие от 1 до 6 чужеродных ферментов и их генетически «сшитые» конструкции. При конструировании штаммов использован подход для введения нескольких гетерологичных кДНК в дрожжевой геном, который включает интеграцию в одну стадию множества копий разных гетерологичных генов в областях rDNA или длинных концевых повторов Ylt1 генома дрожжей. Оценку ингибирующего действия модификаторов-лекарств для синтеза стероидных гормонов осуществляли как в условиях *in vivo*, добавляя модификаторы до/после процесса индукции синтеза чужеродных белков, так и на уровне мембранных структур с использованием методов стационарной кинетики ферментативных процессов.

Результаты и обсуждение

При конструировании трансгенных систем «субстратспецифичные цитохромы P450 — микроорганизм» для тестирования лекарственных средств должны быть сохранены следующие принципы структурно-функциональной организации мультиферментных систем: 1) высокая аффинность белок-белковых взаимодействий и взаимозаменяемость белков в процессе электронного транспорта и гидроксилирования субстратов в трансгенных системах, обуславливающая наиболее эффективное использование восстановительных эквивалентов при активации молекулярного кислорода [2]; 2) сохранение регуляторного принципа равновесия спиновых форм цитохрома P450 в трансгенных системах как проявление наиболее предпочтительных конформаций и редокс-потенциалов при реализации взаимодействий экспрессированных гемопротеидов с физиологическими лигандами [3]; 3) сохранение аффинности при взаимодействии с субстратами и интермедиатами, включая необходимость направленного транспорта, стерического соответствия и проявление в ряде случаев множественных активностей одной молекулярной формой фермента [4, 5].

В настоящее время гетерологическая экспрессия цитохромов P450 млекопитающих в клетках микроорганизмов используется по ряду направлений. Первое связано с экспрессией, выделением и очисткой P450 для изучения роли природных или направленных замен в первичной структуре этого белка, обуславливающих ряд наследственных заболеваний. Второе направление предусматривает использование гетерологической экспрессии для создания модельных систем для поиска эффективных ингибиторов и изучения действия лекарственных субстанций на ферменты биосинтеза стероидов. В рамках третьего направления осуществляется конструирование рекомбинантных микроорганизмов, способных к направленным биотрансформациям стероидных субстратов.

В 1989 году впервые была осуществлена гетерологическая экспрессия цитохрома P450c17 в дрожжах *S. cerevisiae* под контролем промотора алкогольдегидрогеназы [6]. Были сконструированы экспрессионные плазмиды pAα1 и pAα2 для получения P450c17 быка и плазмида pACα1 для химерного P450cα, кодирующая 45 NH_2-концевых аминокислот P450c крысы и 482 COOH-концевых аминокислот P450c17 быка. Позднее были созданы плазмиды, экспрессирующие P450c21 быка (pAγ2) совместно с дрожжевой эндогенной NADPH-цитохром P450-редуктазой (pARγ1), а также сшитые

Национальная академия наук Беларуси

конструкции: P450c21/дрожжевая редуктаза (pAFγR1, pAFγR2 и pAFγR20) и дрожжевая редуктаза/P450c21 (pAFRγ1 и pAFRγ2) [7]. В развитие этих работ были реконструированы две начальных стадии стероидогенеза млекопитающих в дрожжах *S. cerevisiae*, которые осуществляются системой отщепления боковой цепи холестерина с цитохромом P450scc и 3β-гидроксистероид дегидрогеназой/5-ен-4-ен-стероид изомеразой (3β-ГСД) [8]. При использовании холестерина в качестве исходного субстрата возникает проблема, связанная с его проникновением в клетку. Для того, чтобы обойти эту проблему, обмен веществ в *S. cerevisiae* был так изменен, чтобы можно было синтезировать прогестерон *de novo* из простых источников углерода. Отличие эргостерина от холестерина состоит в наличии двойных связей при С-7 и С-22, и метильной группы при С-24, поэтому конструирование биосинтеза было направлено на разрушение гена Δ22-десатуразы и введение Δ7-редуктазы из *Arabidopsis thaliana*. В результате трансгенный штамм способен синтезировать интермедиат эргоста-5-енол вместо эргостерина (эргоста-5,7,22-триенол). Это было ключевым достижением, так как эргоста-5-енол способен поддерживать жизнедеятельность микроорганизмов, заменяя эргостерин в мембранах, и в то же время может служить исходным субстратом для CYP11A1 (P450scc) млекопитающих и 3β-ГСД в синтезе прогестерона. Последний этап биосинтеза глюкокортикоидов протекает под воздействием цитохрома CYP11B1 (P45011β). Успешная экспрессия стероид 11β-гидроксилазы в рекомбинантных дрожжах была описана в работе [9]. Была проведена ко-экспрессия митохондриального адренодоксина и модифицированного цитохрома P45011β, в котором исходная препоследовательность была заменена на дрожжевую. Было установлено, что дрожжи *S. cerevisiae* синтезируют собственный митохондриальный белок, подобный NADPH-зависимой адренодоксинредуктазе.

Нами детально изучена субстратная специфичность рекомбинантных микроорганизмов *S. cerevisiae* GRF 18/YEp5117α, содержащих ген цитохрома P450c17 под контролем промотора *GAL10*. Сконструированные дрожжи осуществляют последовательную биотрансформацию прогестерона до 17α-гидроксипрогестерона и 17α,20α-дигидроксипрегн-4-ен-3-она. Структура соединений доказана на основании данных ВЭЖХ, ТСХ и масс-спектрометрии. Реакция 17α-гидроксилирования обусловлена функциональным сопряжением гетерологично экспрессируемого цитохрома P450c17 и конститутивной NADPH-цитохром P450 редуктазы дрожжей, и эта активность уменьшается в ряду субстратов: прогестерон > 11β-гидроксипрогестерон > 11α-гидроксипрогестерон > 19-гидроксипрогестерон. Реакция 20α-восстановления наблюдается после образования 17α-гидроксипрогестерона, обусловлена дрожжевым белком-ортологом 20α-гидроксистероид-дегидрогеназы млекопитающих, и уменьшается в ряду: 17-α-гидроксипрогестерон > 21-гидроксипрогестерон > 19-гидроксипрогестерон [10]. Поиск по функциональным участкам белков и гомологии структур с использованием PINTS и BLAST [11] позволил идентифицировать соответствующие гены *GCY1* (индуцируемый галактозой кристаллин-схожий белок дрожжей), *YPR1* (альдо-кето редуктаза дрожжей) и *ATF2* (О-ацетилтрансфераза), отвечающие за побочные реакции.

Биотрансформации прегн-4-ен-20(α, β)-ол-3-онов с помощью рекомбинантных *S. cerevisiae* YEp5117α характеризовались протеканием следующих циклов реакций: первоначальным окислением 20(α, β)-дигидропроизводных прогестерона до прогестерона с последующими последовательными 17α-гидроксилированием и 20(α, β)-восстановлением. 20-Окисление обусловлено как обратной реакцией катализируемой собственным ферментом дрожжей, так и оксидазной функцией цитохрома P450c17 [12].

В развитие перечисленных выше работ была осуществлена полная реконструкция синтеза кортизола с использованием рекомбинантных дрожжей *S. cerevisiae* [13]. Кортизол был получен из простого источника углерода в восемь стадий. Весь биосинтез включает собственные стадии биосинтеза стеринов дрожжей, стадию рекомбинантных дрожжей, использующих один растительный фермент, и пять дополнительных ферментативных стадий, катализируемые восемью белками млекопитающих. Были проведены следующие генетические модификации: осуществлена экспрессия растительного фермента (Δ7-редуктазы), в результате чего биосинтез эргостерина приводил к получению со-

Национальная академия наук Беларуси

ответствующих субстратов цитохрома P450scc, а также восьми белков млекопитающих (цитохромов P450scc и P45011β, адренодоксина, адренодоксинредуктазы, P45017α, P450c21, NADPH-зависимой P450 редуктазы, 3β-ГСД), которые вовлечены в биосинтез гормонов в коре надпочечников млекопитающих.

Таким образом, был реконструирован наиболее сложный на сегодняшний день метаболический путь в эукариотических микроорганизмах. Другими словами, был создан биосинтетический аналог коркового слоя надпочечной железы млекопитающих. Безусловно, эта работа является выдающимся достижением в области метаболической протеомики.

Для улучшения биотехнологического потенциала при работе с гидрофобными субстратами дрожжи *Y. lipolytica* были тестированы как организм-хозяин для цитохром P450-катализируемой биотрансформации стероидов или стеролов. При биотрансформации прогестерона рекомбинантными дрожжами *Y. lipolytica* E129A15, экспрессирующими цитохром P450c17 под контролем промотора изоцитрат-лиазы, установлено образование, помимо 17α-гидроксипрогестерона, двух стероидных продуктов — 17α, 20β- и 17α, 20α-дигидроксипрегн-4-ен-3-онов, строение которых доказано с помощью ВЭЖХ, ТСХ и ЯМР-спектроскопии. Окисление хромовой кислотой по Джонсу смесей стероидов (17α-гидроксипрогестерона, 17α, 20β- и 17α, 20α-дигидроксипрегн-4-ен-3-она) сопровождалось расщеплением связи C17-C20 в диолах с образованием андрост-4-ен-3,17-диона — второго продукта ферментативных реакций, катализируемых цитохромом P450c17 [12,14]. Были получены рекомбинантны штаммы *Y. lipolytica*, способные осуществлять ко-экспрессию белков холестерингидроксилазной/лиазной системы (ХГ/Л-система: цитохром P450scc, адренодоксинредуктаза, адренодоксин), обеспечивающих трансформацию холестерина в прегненолон, и цитохрома P45017α, катализирующего образование 17α-гидроксипрегненолона. При конструировании штаммов использован новый подход для введения нескольких гетерологических кДНК в дрожжевой геном, который включает 1) интеграцию в одну стадию множества копий разных гетерологических генов в области rDNA или LTRzeta Ylt1 генома дрожжей и 2) конструирование диплоидных штаммов с использованием разных гаплоидных трансформантов, что позволяет получать новые комбинации экспрессионных кассет в одном диплоидном штамме. Впервые показано, что, используя этот подход, можно конструировать штаммы *Y. lipolytica*, способные экспрессировать, как минимум, 6 разных гетерологических белков, а также их генетически «сшитые» конструкции [15]. На основе плазмид p64PT или p67PT (последовательности, обеспечивающие интеграцию — rDNA или LTRzeta, маркер для селекции *ura3d4* и pICL1-*Sph*I-ICL1t) сконструированы интегративные мультикопийные векторы, содержащие кДНК зрелых форм белков холестерин-трансформирующей системы и P450c17 под контролем промотора изоцитратлиазы. Методом Саузерн-гибридизации показана интеграция до 3-х разных векторов в дрожжевой геном при ко-трансформации гаплоидных реципиентных штаммов *Y. lipolytica*. При диплоидизации выбранных гаплоидных трансформантов получены штаммы, в которых присутствуют разные кассеты экспрессии для всех компонентов холестерин-трансформирующей системы и P45017α [16,17].

На первом этапе для обоснования рекомбинантных микроорганизмов *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117α в качестве фармакологической модели были использованы известные лекарственные соединения, модифицирующие биосинтез стероидов. С этой целью изучено влияние субстанций лекарств (кетоконазола, метирапона, дексаметазона, мифепристона, даназола, левоноргестрела) на соотношение биосинтетической и инактивирующей функций рекомбинантных микроорганизмов. Определены значения Km/Vmax, константы ингибирования и тип ингибирования изученных лекарственных соединений в реакциях 17α-гидроксилирования прогестерона. Использование мифепристона, даназола, левоноргестрела обусловлено тем, что при гетерологической экспрессии в дрожжах P450c17 подвергается непродуктивным циклам восстановления-окисления с образованием кислород-содержащих радикалов, способных активировать ацетиленовую группу этих модификаторов. Активированные модификаторы, благодаря структурному сходству с прогестероном, могут модифицировать аминокислотные остатки активного центра или связываться с гемом

Национальная академия наук Беларуси

Р450с17. Кетоконазол, широко используемый антигрибковый препарат, обладает повышенной избирательностью к дрожжевому цитохрому Р450, осуществляющему 14-деметилирование ланостерина, и применяется до сих пор как стандарт для оценки ингибирующего действия различных соединений на Р450с17. Установлено, что на начальных этапах биотрансформации действие даназола, мифепристона и кетоконазола характеризовалось уменьшением образования 17α-гидроксипрогестерона и потребления прогестерона. Замедленная трансформация прогестерона является результирующей двух последовательных процессов — 17α-гидроксилирования и 20α-восстановления. При соотношении (ингибитор)/(Р450с17) 1000:1 и (ингибитор)/(прогестерон) 1:1 в условиях *in vivo* не было зафиксировано необратимого ингибирования Р450с17 за счет ковалентного связывания даназола или мифепристона в активном центре гемопротеида. Даназол и мифепристон, имеющие как и продукт сопряженную Δ^4-3-кето-структуру и 17-ОН группу, не модифицировали также по структурно-обусловленному механизму дрожжевой аналог 20α-ГСД, так как соотношение 17α-гидроксипрогестерона и 17α, 20α-дигидроксипрегн-4-ен-3-она на начальных этапах было одинаковым как для контрольного эксперимента, так и для биотрансформаций в присутствии модификаторов. Полученные результаты означали, что даназол и мифепристон поступают в клетки, не ингибируют необратимо Р450с17 и дрожжевой аналог 20α-ГСД, но связываются с внутриклеточными структурами. Даназол и мифепристон, как ингибиторы рецепторов прогестерона, не изменили также уровня экспрессии аналога 20α-ГСД. Замедленное образование 17α-гидроксипрогестерона под действием кетоконазола на начальном этапе биотрансформации прогестерона отражает процесс замещения субстратом связанного с железом гема Р450с17 имидазол-содержащего ингибитора — кетоконазола без его влияния на функциональные свойства аналога 20α-ГСД [18,19].

Исследовано влияние комплексных соединений тиофенолов, а также N-замещенных тетразолов на выходы целевого и побочных продуктов при биотрансформациях прогестерона клетками *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117α. Результаты докинга комплексов «молекулярная мишень-лиганд», а также подавление побочных реакций в трансгенных микроорганизмах изложено в соответствующих статьях настоящего сборника.

Заключение

Изложены этапы целевого конструирования трансгенных микроорганизмов для первичного скрининга лекарственных соединений. Установлено, что рекомбинантные микроорганизмы *S. cerevisiae* GRF 18/YEp5117α, содержащие ген цитохрома Р450с17 под контролем промотора *GAL10*, осуществляют последовательную биотрансформацию прогестерона до 17α-гидроксипрогестерона и 17α, 20α-дигидроксипрегн-4-ен-3-она. Реакция 17α-гидроксилирования обусловлена функциональным сопряжением гетерологично экспрессируемого цитохрома Р450с17 и конститутивной NADPH-цитохром Р450 редуктазы дрожжей. При биотрансформации прогестерона рекомбинантными дрожжами *Y. lipolytica* E129A15, экспрессирующими цитохром Р450с17 под контролем промотора изоцитрат-лиазы, установлено образование, помимо 17α-гидроксипрогестерона, двух стероидных продуктов — 17α, 20β- и 17α, 20α-дигидроксипрегн-4-ен-3-онов. Регуляцией активности промотора изоцитрат-лиазы достигнуто 98 %-ное превращение прогестерона в 17α-гидроксипрогестерон в случае *Y. lipolytica* DC5, что исключает необходимость разрушения генов, кодирующих белки-ортологи 20α- и 20β-ГСД. В клетках *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117α даназол и мифепристон не ингибируют необратимо Р450с17 и не изменяют уровня экспрессии белка-ортолога 20α-ГСД. Замедленное образование 17α-гидроксипрогестерона под действием кетоконазола отражает процесс замещения субстратом связанного с железом гема Р450с17 имидазол-содержащего ингибитора — кетоконазола без его влияния на функциональные свойства белка-ортолога 20α-ГСД. Приведены примеры докинга потенциальных лекарственных соединений и ферментов-мишеней в трансгенных микроорганизмах.

Национальная академия наук Беларуси

Список использованных источников

1. О лекарственных средствах: Закон Респ. Беларусь от 20 июля 2006 г. № 161—З.

2. Juvonen, R.O. Purification and characterization of a liver microsomal cytochrome P450 isoenzyme with a high affinity and metabolic capacity for coumarin from pyrasole treated D2 mice / R.O. Juvonen, V.M. Shkumatov, M.A. Lang // Eur. J. Biochem. — 1988. —Vol. 171. — P. 205-211.

3. Quantitation of interaction between cytochrome P450scc and adrenodoxin — analysis in the median UV-region by second derivative spectroscopy / V.M. Shkumatov [et al.] // Chem.-Biol. Inter.- 1988. — Vol. 68. — P. 71—83.

4. The domain structure of the cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria / V.L. Chashchin [et al.] // Biochem. Biophys. Acta. — 1984. — Vol. 787, № 1. — P. 27—38.

5. Shkumatov, V.M. Heterologous reconstitution of monooxygenase systems // 2nd International Symposium on Cytochrome P450 of Microorganisms and Plants, Hachioji-Tokyo, June 13-17 1993. / Inter-University Seminar House, eds M. Breitenbach [et al.]. Tokyo, 1993. — L—28.

6. Expression of bovine cytochrome P-450c17 cDNA in Saccharomyces cerevisiae / T. Sakaki [et al.] // DNA.- 1989. — Vol. 8, N. 6 — P. 409—418.

7. Expression of bovine cytochrome P-450c21 and its fused enzymes yeast NADPH-cytochrome P450 reductase in Saccharomyces cerevisiae / T. Sakaki [et al.] // DNA.—1990. — Vol. 9, № 8 — P. 603—614.

8. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast / C. Duport [et al.] // Nature. Biotechnol. — 1998. — V. 16. — P. 186—189.

9. 11-hydroxylase activity in recombinant yeast mitochondria. In vivo conversion of 11-deoxycortisol to hydrocortisone / B. Dumas [et al.] // Eur. J. Biochem. — 1996. — V. 238, № 2. — P. 495—504.

10. Biotransformation of steroids by a recombinant yeast strain expressing bovine cytochrome P45017 / V.M. Shkumatov [et al.] // Biochemistry (Moscow). — 2002. — V. 67, № 4. — P. 547—560.

11.Stark, A. Finding functional sites in structural genomics proteins / A. Stark, A.V. Shkumatov, R.B. Russell // Structure. 2004. — Vol. 12. — P. 233—242.

12. Oxidation of 17α,20β- and 17α,20α-dihydroxypregn-4-en-3-ones, side products of progesterone biotransformation with recombinant microorganisms expressing cytochrome P45017α. / V.M. Shkumatov [et al.] // Bioorg. Chem. 2003. — Vol. 29, № 6. — P. 640—647.

13. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast / F.M. Szczebara [et al.] // Nature. Biotechnol. — 2003. — V. 21. — P. 143—149.

14. Range of substrates and steroid bioconversion reactions performed by recombinant microorganisms Saccharomyces cerevisiae and Yarrowia lipolytica expressing cytochrome P450c17 / V.M. Shkumatov [et al.] // Appl. Biochem. Microbiol. — 2006. — Vol. 42, No. 5. — P. 472—478.

15. Formation and functioning of fused cholesterol side-chain cleavage enzymes. / P.A. Nazarov [et al.] // DNA Cell. Biol. — 2003. — Vol. 22, № 4. — P. 243—252.

16. Shkumatov, V.M. Recombinant microorganisms for the synthesis of steroids and testing of medicines / V.M. Shkumatov // EMBO Workshop The Chemistry and Biochemistry of Catalysis by Biological Systems, Hamburg, 20-22 June 2007./ European Molecular Biology Laboratory, eds. A. Schmidt [et al]. — Hamburg, 2007. — P. 63—69.

17. Новые подходы к синтезу стероидов и тестированию лекарственных соединений / В.М. Шкуматов и др. // XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Том. 4. Биомолекулярная химия и биотехнология, Москва, 23-28 сентября 2007. / тезисы докл: В 5 т.; т.4., Ю.С. Осипов [и др.] — М.: Граница, 2007.— 640 с.

18. Effect of steroid biosynthesis modifiers on progesterone biotransformation by recombinant yeasts expressing cytochrome P450c17 / V.M. Shkumatov [et al.] // Biochem. (Mosc.) Supplement Series B: Biomed. Chem. — 2007. — V. 1, №. 1. — P. 87—94.

19. Шкуматов, В.М. От структуры ферментов к новым генно-инженерным технологиям и ферментотерапии / В.М. Шкуматов // Изв. Нац. акад. наук Беларуси. Серия биол. наук. — 2007. Специальный выпуск. С. 82—89.

Дата поступления статьи 9 апреля 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 616-006.88:599

О.В. Квитко, Я.И. Шейко, И.И. Конева, С.Е. Дромашко

РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДНЫХ АНТИРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Важным аспектом создания средств антираковой терапии является учет гетерогенности популяции раковых клеток. В ряде исследований установлено, что особая клеточная фракция, представленная раковыми стволовыми клетками (cancer stem cells), отвечает за неограниченную пролиферацию раковых клеток крови, злокачественных опухолей *in vivo* и ряда раковых клеточных линий, культивируемых *in vitro* [1]. Важность стволовых раковых клеток демонстрируется тем, что они иногда составляют лишь небольшую долю (менее одной сотой) всей клеточной популяции.

Один из методов выделения клеточных фракций, обогащенных раковыми стволовыми клетками, основан на их свойстве исключения прижизненных (витальных) цитохимических красителей из цитоплазмы. Использование красителя Hoechst 33342, образующего флуоресцирующий зеленым светом комплекс с клеточной ДНК, в сочетании с проточной цитометрией, показало, что потенциально бессмертные раковые линии, выращиваемые *in vitro* в течение десятилетий, содержат небольшую фракцию клеток, исключающих краситель и вызывающих опухоли при введении экспериментальным мышам [1]. Этот результат был воспроизведен на ряде раковых линий человека и грызунов, неполный перечень которых включает линии глиомы, рака молочной железы, простаты, гепатоклеточной карциномы, чешуйчатой карциномы головы и шеи и карциномы поджелудочной железы.

В соответствии с принятой в современной цитоонкологии концепцией раковых стволовых клеток, раковые клеточные популяции как *in vivo*, так и *in vitro* состоят в основном из стареющих клеток, которые либо вообще не делятся и погибают, либо формируют небольшие клеточные клоны, также обреченные на гибель. Возможность неограниченного роста раковой клеточной популяции обеспечивается потенциально бессмертными раковыми стволовыми клетками, которые не только воспроизводят сами себя, но также дифференцируются в стареющие клетки.

При разработке эффективных противораковых средств принципиально важно учитывать то, что стволовые раковые клетки отличаются повышенной резистентностью к повреждающим воздействиям, включая радиацию [2] и химиопрепараты [3]. Повышенная устойчивость потенциально бессмертной клеточной субпопуляции к цитотоксическим воздействиям может быть причиной того, что методы терапии, основанные на повреждении клеток, зачастую лишь временно затормаживают либо даже уменьшают массу опухоли, но рост злокачественных новообразований часто возобновляется. Альтернативным подходом в разработке противораковых средств является так называемая дифференцировочная терапия (differentiation therapy), основанная на пластичности раковых стволовых клеток, то есть их способности дифференцироваться если не в нормальные, то по крайней мере в стареющие раковые клетки, которые либо вообще не делятся и вскоре погибают, либо делятся ограниченное число раз, давая небольшие клеточные клоны, которые, в конечном счете, также погибают [4].

Нельзя даже полностью исключить возможность полной нормализации раковых клеток под влиянием подобранных внешних условий, что подтверждается классическими работами, в которых клетки тератокарциномы формировали жизнеспособные химерные эмбрионы мыши [5]. Этот уникальный эффект нормализации рако-

Национальная академия наук Беларуси

вых клеток может быть обусловлен действием эмбриональных морфогенетических медиаторов (включая, по-видимому, белковые факторы роста). Вместе с тем ясно, что с точки зрения разработки методов антираковой терапии более реалистичной возможностью представляется именно использование способности стволовых раковых клеток дифференцироваться не в нормальные, а в раковые стареющие клетки. Ведь этот процесс происходит спонтанно во многих (если не во всех) популяциях раковых клеток, и остается найти способы его интенсификации. Необратимая регрессия опухоли произойдет в том случае, если скорость возобновления стволовых раковых клеток будет меньше, чем темп их дифференцировки в стареющие клетки.

Материалы и методы

В работе проанализированы материалы научных статей (опубликованных в PubMed Medline), связанных с проблемой разработки новых средств терапии рака на основе полинуклеотидных препаратов, а также собственные данные авторов о гетерогенности раковых клеточных популяций и об антираковых эффектах экзогенных нуклеиновых кислот.

Результаты и обсуждение

Методы дифференцировочной терапии уже используются для лечения некоторых форм рака. В частности, ретиноевая кислота (метаболит витамина А), индуцирующая клеточную дифференцировку, используется для лечения промиелоцитарной лейкемии [6]. Антираковая активность витамина А, ретиноевой кислоты и ее многочисленных аналогов продемонстрирована на различных моделях спонтанного и индуцированного рака. Успешное клиническое применение ретиноидов в дерматологии также подкрепляет надежду на то, что они могут стать важным средством в предотвращении и лечении раковых заболеваний [7]. Препараты на основе ретиноидов представляют интерес и для усиления радиационного воздействия на раковые клетки. Так, на линии рака легкого человека A549 показан радиосенсибилизирующий эффект водорастворимого коньюгата производного ретинамида (4HPR) и поли-L-глутаминовой кислоты, PG-4HPR [8]. Исследования механизма дифференцировочной активности ретиноидов привели к открытию ядерных ретиноидных рецепторов, которые относятся к генному суперсемейству рецепторов стероидных гормонов [7].

С целью акцентирования на генетических процессах, являющихся основой клеточной дифференцировки, наряду с термином «дифференцировочная терапия» используется понятие «эпигенетическая терапия» — epigenetic therapy [9]. Дифференцировка происходит в результате эпигенетических процессов, то есть достаточно стабильных (включая полностью необратимые) изменений активности генов, которые могут наследоваться в клеточных поколениях. Именно эпигенетическая изменчивость, а не оперативные кратковременные обратимые изменения генной активности, необходимые для регуляции метаболизма, обеспечивает как тканевую дифференцировку, так и дифференцировку раковых стволовых клеток в стареющие.

«Эпигенетический ландшафт» опухолевой клетки играет важную роль в определении ее судьбы. Среди молекулярных механизмов эпигенетической изменчивости, связанных с малигнизацией клеток, исследователи выделяют метилирование ДНК и ацетилирование гистоновых белков хроматина. Изменения метилирования ДНК и посттрансляционной модификации гистонов приводят к модификации структуры хроматина и изменению паттерна экспрессии различных генов. На основании этого ведутся поиски и клинические испытания веществ, получивших название «эпигенетические модуляторы» [10] или «эпигенетические лекарства» — epigenetic drugs [11]. К эпигенетическим модуляторам, наряду с упомянутыми выше ретиноидами, относятся ингибиторы таких ферментов, как ДНК-метилтрансферазы (обеспечивающие метилирование ДНК) и гистоновые деацетилазы (уменьшающие уровень ацетилирования

Национальная академия наук Беларуси

гистонов хроматина). Например, 5-азацитидин ингибирует ДНК-метил-трансферазы, а трихостатин А блокирует гистоновые деацетилазы [11].

Эпигенетическая терапия рака находится в самом начале своего развития. Еще не обнаружены наиболее эффективные способы управления эпигенетической изменчивостью раковых стволовых клеток в направлении клеточного старения и гибели (предложенная нами иллюстрация принципа эпигенетической антираковой терапии представлена на рисунке (Рис.1).

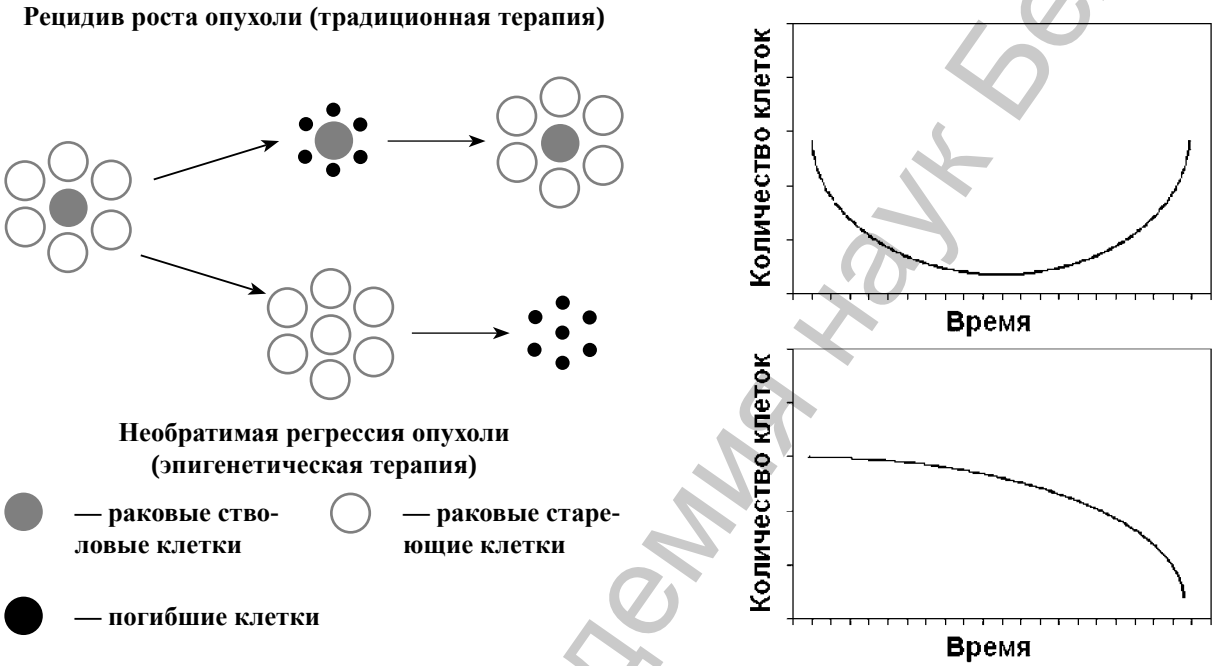


Рис. 1. Эпигенетическая терапия рака.

Опухоль состоит, в основном, из стареющих клеток, которые либо вообще не делятся и погибают, либо формируют небольшие клеточные клоны, также обреченные на гибель. Неограниченный рост опухоли обеспечивается небольшой фракцией потенциально бессмертных раковых стволовых клеток (cancer stem cells), которые воспроизводят сами себя, а также дифференцируются в стареющие клетки. При традиционной противораковой терапии (conventional therapy), основанной на повреждении и гибели клеток, вначале число клеток в опухоли уменьшается. Однако стволовые раковые клетки отличаются повышенной резистентностью к повреждающей терапии. Поэтому они выживают, и рост опухоли возобновляется. При эпигенетической терапии (epigenetic therapy) происходят изменения спектра активности генов, ведущие к ускорению дифференцировки раковых стволовых клеток в стареющие, что приводит к необратимой регрессии опухоли.

Поэтому представляется перспективным широкий экспериментальный поиск средств, влияющих на эпигенетические процессы в популяциях раковых клеток. В связи с этим особую значимость приобретает разработка экспериментальных систем на основе культур клеток *in vitro*, с помощью которых можно тестировать вещества по их воздействию на процессы дифференцировки раковых стволовых клеток. Эта работа может быть выполнена на основе исследований нашей лаборатории [12].

Нами разработаны методы анализа клеточных популяций на основе компьютерной видеомикроскопии живых клеток [13]. С помощью этого экспериментального подхода установлено, что клоны, формируемые большей частью клеток линии рака легкого А549, после нескольких репликаций погибают по механизму апоптоза, что проявляется в конденсации клеток (Рис. 2). В то же время в том же эксперименте были обнаружены клоны с неограниченным ростом.

Национальная академия наук Беларуси

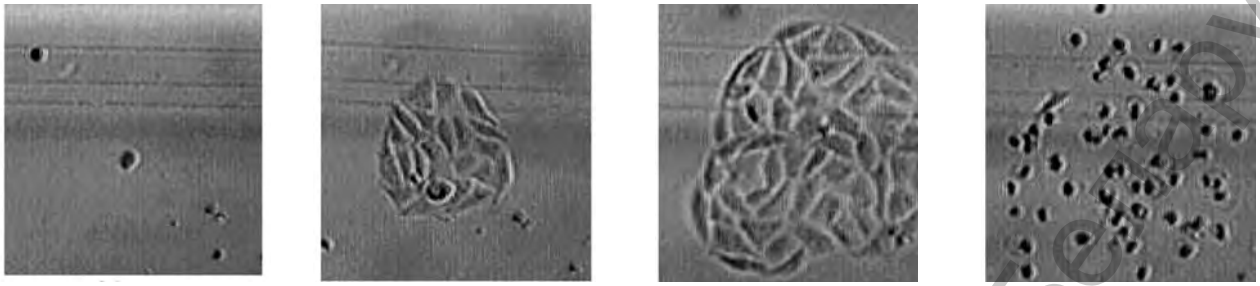


Рис. 2. Формирование и гибель клеточного клона линии рака легкого А549.

Важно отметить, что разработанная нами методика клонального анализа живых клеточных культур позволяет прослеживать процессы пролиферации, дифференцировки и гибели одновременно многих (десятков и сотен) клеточных клонов на протяжении ряда дней. Это позволяет проводить детальную оценку воздействий различных препаратов на различные компоненты клеточной популяции, включающей как стареющие, так и бесконечно растущие клоны, которые берут начало от раковых стволовых клеток. В результате обеспечивается поиск не только воздействий, которые оказывают на популяцию раковых клеток хотя и массовый, но временный ингибирующий эффект (замедляя митотические деления и ускоряя гибель стареющих клонов). Становится реальным также выявление средств (которые можно считать эпигенетическими модуляторами — см. выше), индуцирующих дифференцировку потенциально бессмертных стволовых раковых клеток в направлении старения, что необходимо для стабильной регрессии опухоли.

Натуральные и синтетические двуспиральные полинуклеотиды (ДНК и РНК) являются перспективной основой для создания лекарственных препаратов, включая антираковые. Необходимо особо отметить, что генетическая трансформация, то есть внедрение экзогенного генетического материала в геном клетки с последующей экспрессией привнесенного фрагмента ДНК, является не единственным механизмом биологических эффектов экзогенных нуклеиновых кислот. В 2006 году Нобелевская премия по физиологии и медицине была присуждена двум американским генетикам Файеру и Меллоу (Fire and Mello) за открытие РНК-интерференции, т.е. ингибирования работы генов посредством двуспиральных РНК [14].

Механизм РНК-интерференции основан на разрушении матричной РНК определенного гена особыми белками, образующими комплекс с небольшими (как правило, 20–30 нуклеотидных пар) молекулами двуспиральной РНК, в которых есть участок, комплементарный к соответствующему району матричной РНК [15]. Таким образом, регуляторная эффективность двуспиральной РНК напрямую определяется ее нуклеотидной последовательностью. Это открывает широкие возможности подбора двуспиральных РНК для управления работой различных генов. Следует также особо отметить, что в клетке имеются сотни генов, кодирующих большое количество разнообразных микроРНК, которые регулируют работу ряда других генов. Следовательно, в тотальных препаратах нуклеиновых кислот, выделяемых из организмов разных видов, из разных тканей одного вида, и даже из разных индивидуумов в пределах одного вида, могут присутствовать различные наборы регуляторных РНК-олигонуклеотидов, что может определять их различный биологический эффект при введении в организм или в культуру клеток.

Значительное развитие получили также исследования генорегуляторных эффектов антисмысловых РНК, то есть односпиральных олигонуклеотидов, комплементарных матричной РНК генов. Между олигонуклетидом и комплементарным участком матричной РНК путем Уотсон-Криковского взаимодействия образуется гетеродуплекс, что приводит к блокировке

Национальная академия наук Беларуси

трансляции матричной РНК в соответствующий белок. Интересно, что явление РНК-интерференции двуспиральными РНК было открыто Файером и Меллоу именно в экспериментах с антисмысловыми РНК.

Особый интерес к антисмысловым РНК обусловлен их использованием для создания препаратов, избирательно ингибирующих гены, которые аномально активны в злокачественных клетках. В исследованиях по разработке новых антираковых препаратов утвердился термин антисенсорная (антисмысловая) терапия — «antisense therapy» [16].

Длина антисенсорных олигонуклеотидов составляет 14-20 нуклеотидов. Их эффект высоко специфичен (поскольку основан на их точной комплементарности участкам соответствующих матричных РНК) и позволяет репрессировать определенный ген, не затрагивая остальных.

Вследствие высокой избирательности антисмысловой терапии ее также называют таргетной терапией (от англ. target — цель). Например, находящийся в стадии клинических испытаний генасенс (Джента Инкорпорэйтед, США) является 18-мерфосфоротиоатом олигонуклеотида, имеющего сродство к участку мРНК, кодирующей белок Bcl-2, повышенная продукция которого в раковых клетках защищает их от апоптоза (особой формы клеточной гибели). Блокируя продукцию белка Bcl-2, генасенс усиливает процессы апоптоза. На клеточных линиях немелкоклеточного рака легкого показано, что генасенс снижает уровень Bcl-2, замедляет клеточную пролиферацию и ускоряет апоптоз. Генасенс также может усиливать противоопухолевую эффективность других препаратов, включая доцетаксел, паклитаксел, карбоплатин, винорельбин и ритуксимаб [17].

Генасенс проходит клинические испытания в России и США для лечения пациентов с прогрессирующей меланомой (препарат поставляется во флаконах в виде раствора по 10 мл с содержанием 300 мг действующего вещества во всем объеме).

Ведутся разработки антисенсорных препаратов и для лечения ряда других онкозаболеваний. Необходимым этапом таких исследований является изучение эффектов препарата на культурах опухолевых клеток.

Однако действие экзогенных нуклеиновых кислот не исчерпывается генетической трансформацией, РНК-интерференцией и генной регуляцией с помощью антисмысловой РНК. Были обнаружены разнообразные эффекты экзогенных нуклеиновых кислот при введении в организм и в клеточные культуры. В частности, ведутся исследования иммуностимулирующего действия натуральных нуклеиновых кислот (выделяемых из различных организмов) и синтетических полинуклеотидов. В процессе изучения механизмов противомикробного иммунитета обнаружено, что одноцепочечные G-C олигодезоксинуклеотиды (последовательности которых представляют собой чередующиеся гуанин и цитозин) стимулируют врожденный иммунитет (моноциты периферической крови цыплят), а добавление полиинозиновой-полицитидиловой кислоты — poly I:C (синтетического аналога двунитевой РНК) усиливает этот эффект, хотя препарат poly I:C сам по себе малоэффективен [18]. Таким образом, открываются возможности комбинирования полинуклеотидных препаратов для усиления требуемого биологического эффекта. Было установлено, что в механизме иммуностимулирующих эффектов экзогенных нуклеиновых кислот участвуют мембранные Толл-рецепторы (toll receptors). Отсюда следует важный вывод: существуют такие биологически значимые эффекты экзогенных полинуклеотидов, которые обусловлены не их проникновением в клетку, а регуляторным воздействием на сигнальные рецепторы клеточной поверхности, которые запускают каскад внутриклеточных реакций, среди которых центральное место принадлежит изменениям экспрессии генов. Это значительно расширяет перспективы использования полинуклеотидных препаратов для управления биологическими процессами, поскольку даже при высокой концентрации в клеточном окружении далеко не всегда происходит эффективное проникновение экзогенных нуклеиновых кислот в клетку (для преодоления данного барьера при получении трансгенных клеток и организмов обычно применяются специальные методы). В пользу перспективности подбора полинуклеотидных препаратов для противораковой терапии свидетельствует обнаруженный нами [19] ярко выраженный ингибирующий эффект коммерческого препарата ДНК из эритроцитов цыплят на культуру клеток HeLa (Рис. 3).

Национальная академия наук Беларуси

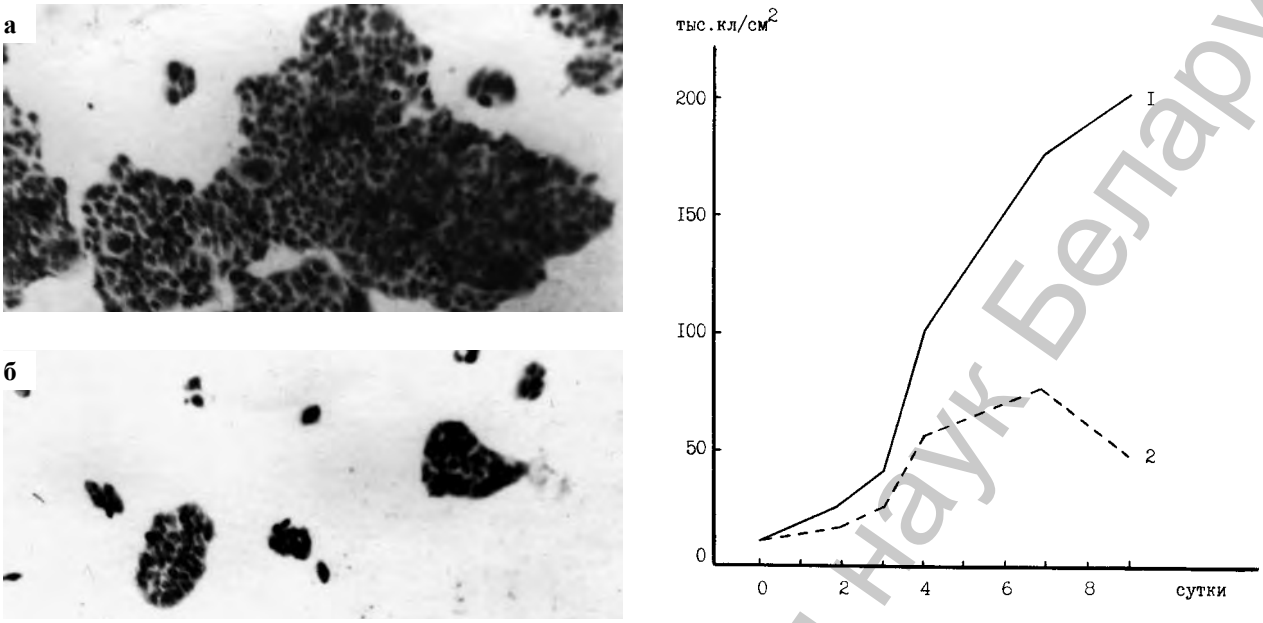


Рис. 3. Антираковый эффект ДНК эритроцитов цыплят: а — культура HeLa (посевная плотность 5000 клеток на квадратный сантиметр); б — культура HeLa с добавлением ДНК (100 мкг/мл); культивирование в течение 7 суток. Справа — динамика плотности культуры HeLa (посев 10000 кл/см^2) в контроле (I) и с добавлением ДНК эритроцитов цыплят (2).

Интересно, что относительная степень уменьшения количества клеток под влиянием ДНК постепенно нарастала, причем после 6 дней культивирования происходило абсолютное уменьшение числа клеток. Такая динамика изменения числа клеток под влиянием препарата ДНК соответствует теоретически ожидаемому постепенному нарастанию антиракового эффекта в случае эпигенетической терапии, основанной на дифференцировке раковых стволовых клеток в направлении старения и гибели (Рис. 1). Механизм обнаруженного эффекта неизвестен и может быть обусловлен, в частности, как проникновением фрагментов ДНК в клетку [20], так и их воздействием на мембранные рецепторы.

Заключение

Представляется целесообразным использовать разработанные нами методы компьютерной видеомикроскопии живых клеток для подбора простых и комбинированных препаратов ДНК и РНК (варьирующих по нуклеотидной последовательности и размеру фрагментов), которые направляют генетическую изменчивость раковых стволовых клеток в сторону пролиферативного ограничения и гибели клеточных клонов.

Список используемых источников

1. Kondo, T. Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines / T. Kondo // Cancer Biomark. — 2007. — Vol. 3, № 4/5. — P. 245—250.

2. Rich, J.N. Cancer stem cells in radiation resistance / J.N. Rich // Cancer Res. — 2007. — Vol. 67, № 19. — P. 8980—8984.

3. Cancer stem cell // Wikipedia, the free encyclopedia [Electronic resource] — 2008. — Mode of access: http://en.wikipedia.org/wiki/Cancer_stem_cell. — Date of access: 15.04.2008.

4. Lotem, J. Epigenetics and the plasticity of differentiation in normal and cancer stem cells /

Национальная академия наук Беларуси

J. Lotem, L. Sachs // Oncogene. — 2006. — Vol. 25, № 59 — P. 7663—7672.

5. The stem cells of a primordial germ cell-derived teratocarcinoma have the ability to form viable mouse chimeras / K. Hanaoka [et al.] // Differentiation. — 1991. — Vol. 48, № 2. — P. 83—87.

6. Sell, S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy / S. Sell // Crit. Rev. Oncol. Hematol. — 2004. — Vol. 51, № 1. — P. 1—28.

7. Ross, A.C. Advances in Retinoid Research: Mechanisms of Cancer Chemoprevention / A.C. Ross // J. Nutr. — 2003. — Vol. 133, № 1. — P. 271—272.

8. Polymeric retinoid prodrug PG-4HPR enhances the radiation response of lung cancer / G. Zhu [et al.] // Oncol. Rep. — 2007. — Vol. 18, № 3. — P. 645—651.

9. Bruecker, B. DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy / B. Bruecker, F. Lyko // Trends in Pharmacological Sciences. 2004. — Vol. 25, № 11. — P. 551—554.

10. Differential role of epigenetic modulators in malignant and normal stem cells: a novel tool in preclinical in vitro toxicology and clinical therapy / S. Snykers [et al.] // Arch. Toxicol. — 2007. — Vol. 81, № 8. — P. 533—544.

11. Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: biomolecular aspects and clinical applications / L. Sigalotti [et al.] // J. Cell Physiol. — 2007. — Vol. 212, № 2. — P. 330—344.

12. Группа изучения процессов клеточного старения // Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси [Электронный ресурс]. — 2007. — Режим доступа: http://labmcp.at.tut.by. — Дата доступа: 15.04.2008.

13. Hunting the mechanisms of self-renewal of immortal cell populations by means of real-time imaging of living cells / O.V. Kvitko [et al.] // Cell Biology International. — 2005. — Vol. 29, № 12. — P. 1019—1024.

14. Press release: The nobel prize in physiology or medicine // The nobel assembly at Karolinska institute [Electronic resource]. — 2006. — Mode of access: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/press.html. — Date of access: 15.04.2008.

15. Kim, V.N. Small RNAs: classification, biogenesis, and function / V.N. Kim // Molecules and Cells. — 2005. — Vol. 19, № 1. — P. 1—15.

16. VIII российский онкологический конгресс // Российский онкологический www-сервер [Электронный ресурс] — 2004. — Режим доступа: http://www.rosoncoweb.ru /library/8th_conf/18.htm.

17. Бычков, М.Б. Современная химиотерапия немелкоклеточного рака легкого / М.Б. Бычков, С.А. Большакова, Ю.М. Бычков. // Журнал «Здоровье Украины» [Электронный ресурс]. — 2004. — № 88. — Режим доступа: http://www.health-ua.com/articles/555.html. — Дата доступа: 15.04.2008.

18. Synergy of CpG oligodeoxynucleotide and double-stranded RNA (poly I:C) on nitric oxide induction in chicken peripheral blood monocytes / H. He [et al.] // Mol. Immunol. — 2007. — Vol. 44, № 12. — P. 3234—3242.

19. Квитко,О.В. Антираковый эффект экзогенных нуклеиновых кислот / О.В. Квитко, Л.Н. Жукова, И.И. Конева // Доклады АН Беларуси. — 1992. — Т. 36, № 7/8. — С. 652—655.

20. Natural human gene correction by small extracellular genomic DNA fragments / L.A.Yakubov [et al.] // Cell Cycle. — 2007. — Vol. 6, № 18. — P. 2293—2301.

Дата поступления статьи 27 марта 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 577.21:575

Т.Д. Кужир

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПРОГНОЗА, ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ РАКА С УЧЕТОМ РОЛИ РЕПАРАЦИИ ДНК В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ (ОБЗОР)

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Генетическая безопасность и здоровье населения зависят от состояния окружающей среды, при этом ионизирующее излучение представляет серьезный фактор риска. Так, мониторинг последствий Чернобыльской катастрофы продемонстрировал генетические эффекты низкодозового облучения, сопряженные с ускорением мутационного процесса в окружающей среде, развитием геномной нестабильности и усилением канцерогенеза [1–6]. В связи с ухудшением экологической обстановки наблюдается глобальный рост онкозаболеваемости. По данным Международного агентства по исследованию рака в 2000 г. зарегистрировано 10 млн. случаев онкологических заболеваний, а через 20 лет прогнозируется увеличение их числа до 16 млн. [7]. Эта проблема требует комплексного решения, что предполагает разработку новых методов ранней диагностики, профилактики и лечения рака на основе знаний молекулярных механизмов, ответственных за его этиологию и патогенез. Известно, что повреждения ДНК, реализующиеся в виде генных и хромосомных мутаций, вносят существенный вклад в канцерогенез. Защита генома от экзогенных и эндогенных мутагенов, поддержание его целостности и стабильности будет способствовать как предотвращению, так и подавлению этого процесса.

Устранение повреждений ДНК осуществляется репарационной машиной, а одним из способов внешней защиты генома является применение антимутагенов. Наиболее пристальное внимание уделяется антимутагенам растительного происхождения, так как эпидемиологическими исследованиями показано, что диета, богатая антиоксидантами и растительными волокнами, имеет существенное значение для предотвращения рака [8, 9]. Однако синтетические препараты могут оказаться не менее перспективными. Среди группы синтетических производных 1,4-дигидропиридина (1,4-ДГП) нам удалось выявить эффективные антимутагены, которые защищают половые и соматические клетки животных от различных мутагенных факторов [10–13]. На экспериментальных моделях ранее установлено, что спектр аддуктов ДНК существенно не различается при спорадическом и индуцированном опухолеобразовании [14], указывая на роль фонового мутагенеза в инициации рака. Один из исследованных нами препаратов в опытах на дрозофиле снижал частоту спонтанных мутаций на 80 % [15]. Столь уникальная способность делает весьма актуальным изучение данного соединения в качестве антиканцерогена. Кроме того, экспериментальные данные *in vivo* и *in vitro* позволяют предполагать, что его генопротекторная активность опосредована влиянием на репарацию ДНК [15–17]. В свою очередь, репарация ДНК рассматривается как важнейший механизм, вовлеченный в клеточный ответ на генотоксичный стресс, и в то же время как молекулярная мишень терапевтического и превентивного воздействия при канцерогенезе [18].

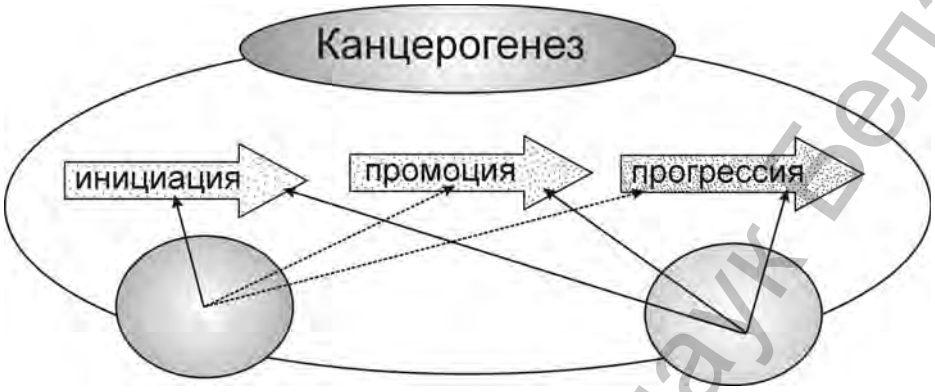
Выявление и детальное изучение возможности контролировать репарацию ДНК с помощью антимутагенов на клеточных моделях будет способствовать продвижению новых технологий в практическую медицину.

Молекулярные основы канцерогенеза: роль репарации ДНК

Канцерогенез является результатом воздействия на человека экзогенных и эндогенных

Национальная академия наук Беларуси

факторов. К первым относятся факторы окружающей среды и образ жизни, ко вторым — генетические, иммунологические и гормональные свойства организма [7]. Влияние внешних и внутренних факторов на канцерогенез отражено на схеме (Рис.1).



Внешние факторы — мутагены и канцерогены окружающей среды

Внутренние генетически обусловленные факторы, в т.ч. репарация ДНК

Рис.1. Схема канцерогенеза.

Экзогенные факторы имеют превалирующее значение *на стадии инициации рака*. Хорошо известно, что ионизирующая радиация и химические мутагены вызывают опухоли. Критическим событием этой стадии является образование аддуктов ДНК, среди которых особый интерес представляют окислительные повреждения [19], индуцированные активными формами кислорода (АКФ). АКФ являются медиаторами радиационного поражения [20, 21], а также продуцируются под влиянием многих мутагенов непрямого действия и так называемых негенотоксичных канцерогенов [15]. Кроме того, АКФ образуются на *стадии промоции* и выступают посредниками воспалительной реакции и апоптоза через активацию редокс-чувствительного транскрипционного фактора *NF-kB* [22, 23].

Модифицированная под влиянием АКФ и других электрофильных молекул, ДНК подвергается репарации, а нерепарированные повреждения препятствуют репликации и/или трансформируются в мутации и структурные повреждения хромосом. Аддукты ДНК и цитогенетические нарушения в виде микроядер, обменов сестринских хроматид и хромосомных аберраций расцениваются как ранние маркеры канцерогенеза, тогда как генные мутации приводят к отдаленным последствиям, например, к активации проонкогенов либо подавлению их супрессоров, что проявляется на поздних стадиях [7, 24, 25].

К генетическим свойствам организма, предрасполагающим к онкопатологии, относятся дефекты в системах биотрансформации ксенобиотиков (подробнее в обзорах [7, 26, 27]). Другим важнейшим фактором риска является нарушение репарационных функций. Так, установлено, что 0,5 % популяции человека гетерозиготна по мутациям в гене *hMSH2*, который участвует в репарации неспаренных оснований (*mismatch repair*), и эти мутации связаны с высокой частотой возникновения рака толстого кишечника [28]. Накапливаются доказательства, что наследственный неполипозный колоректальный рак обусловлен мутациями в этом и других сопряженных генах (*hMLH1* и *hPMS2*) [29, 30].

Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, преимущественно контролирующих репарацию двунитевых разрывов ДНК, повышают риск рака молочной железы и яичника, поэтому могут служить биомаркерами предрасположенности к этим заболеваниям [31, 32].

Таким образом, на первой стадии канцерогенеза *одной из главных мишеней для превентивного действия антимутагенов являются репарационные системы*, при этом преследуются цели восстановления структуры поврежденной ДНК и уменьшения количества фиксированных мутационных событий.

Национальная академия наук Беларуси

В связи с ролью АКФ в инициации и промоции рака большой интерес вызывает система эксцизионной репарации оснований (*base excision repair, BER*), т.к. именно с ее помощью осуществляется репарация окислительных повреждений ДНК [33—35]. *BER* представляет собой важнейший репарационный путь для безошибочного устранения искаженных оснований ДНК, а также однонитевых разрывов, возникающих вследствие нормального метаболизма ДНК или под действием эндогенных и экзогенных ДНК-повреждающих факторов [36]. Поэтому *BER* вполне обоснованно рассматривается в качестве потенциальной мишени антиканцерогенеза [37]. Кроме того, эта система устраняет значительную часть радиационных повреждений [38], и ее состояние очень важно учитывать при радиотерапии рака. Так, уже предложены новые пути повышения эффективности лечения рака за счет подавления *BER* в опухолевых клетках, резистентных к химио- и радиотерапии, и увеличения устойчивости нормальных клеток к повреждениям ДНК вследствие повышенной экспрессии генов этой системы репарации [37, 39].

То же самое относится к эксцизионной репарации нуклеотидов *(nucleotide excision repair, NER*) — наиболее универсальной безошибочной репарационной системе, устраняющей все известные повреждения ДНК [40]. Роль *NER* в предотвращении канцерогенеза вытекает из исследований молекулярных механизмов пигментной ксеродермы, которая сопровождается 100 %-м раком кожи и обусловлена мутациями ряда генов репарации, ответственных за обе ее ветви (*global genome excision repair — GGNER* и *transcriptional coupled excision repair — TCNER*) [41–43]. Эта система также рассматривается как потенциальный кандидат для превентивного и терапевтического воздействия при онкопатологии [18].

Вклад репарации двунитевых разрывов ДНК в ответ клеток на облучение и канцерогенез

Как известно, двунитевые разрывы ДНК (*double strand breaks, DSB*) являются специфическим маркером облучения, а также возникают в ходе репликации, рекомбинации, мейоза, дифференциации и других нормальных клеточных процессов [44—46]. Неоднократно обсуждался вклад индуцированных двунитевых разрывов ДНК в дестабилизацию генома и опухолевую трансформацию клеток [47—49].

Репарация двунитевых разрывов ДНК происходит двумя путями: с помощью гомологичной рекомбинации (*homologous recombination*) и воссоединением негомологичных концов (*non-homologous end joining, NHEJ)* [50—52]. Благодаря изучению генетических основ наследственных синдромов хромосомной нестабильности (СХН) открыты многие гены репарации ДНК у человека. В частности, оказалось, что анемия Фанкони, синдромы Луи-Бар и Ниймеген обусловлены дефектами в системе репарации двунитевых разрывов ДНК [53, 54]. В то же время, при этих заболеваниях наблюдается выраженная склонность к канцерогенезу. Показано, что наиболее значимым для репарации двунитевых разрывов является комплекс *Mre11/ Rad50/NBS* [55], а мутация в гене *NBS1*, характерная для синдрома Ниймеген, приводит к инактивации нибрина, который играет ключевую роль в регуляции функционирования этого комплекса [56]. Анемия Фанкони ассоциирована с нарушениями в генах *FANCA–G*, что выражается в подавлении гомологичной рекомбинации [57]. Следует особо подчеркнуть наличие *FANC/BRCA* пути репарации ДНК [58] и предрасположенность гетерозиготных носителей мутаций в генах *FANC* к раку молочной железы [59]. ATM-киназа (*ataxia telangiectasia mutated*) является сигнальной молекулой, запускающей клеточный ответ на двунитевые разрывы ДНК, в том числе индуцированные ионизирующим излучением [60, 61]. Этот протеин открыт благодаря изучению атаксии телангиэктазии (синдрома Луи Бар) [62]. ATM-киназа в норме фосфорилирует белки, включая нибрин, вовлеченные в репарацию ДНК [63, 64]. Кроме того, ATM-киназа регулирует клеточный цикл [65] и наряду с супрессором опухолевого роста *p53*, а также продуктами генов *BRCA1, BRCA2* и *checkpoint*-киназами рассматривается как барьер для *опухолевой прогрессии* [66, 67].

Уже известно около 150 генов репарации [68, 69]. Сведения о некоторых из них в связи с оценкой онкологического риска и возможного влияния на профилактику и лечение рака представлены в таблице.

Национальная академия наук Беларуси

Таблица

Гены репарации человека, их функции и роль в канцерогенезе

Гены репарации ДНК, локализация	Продукты, их функции	Оценка онкориска	Мишень воздействия
1	2	3	4
Эксцизионная репарации оснований (*BER*)			
OGG1 3p26.2	**ДНК-гликозилазы**, инициирующие процесс *BER* путем вырезания модифицированного основания: 8-оксигуанин-гликозилаза (удаляет 8-оксигуанин напротив С).	Учитывая роль АКФ в канцерогенезе и вклад *BER* в репарацию окисленных оснований ДНК, можно предполагать повышение риска возникновения рака вследствие дефектов этой системы репарации.	Предполагается, что *BER* может быть мишенью превентивного и терапевтического воздействия.
MYH 1p34.3-p32.1	8-оксигуанин-гликозилаза (удаляет неспаренный аденин напротив 8-оксигуанина).		
APE1 14q12	**АР-эндонуклеазы**, разрезающие нить ДНК вблизи от апуринового сайта .		
APE2 X			
XRCC1 19q13.2	**ДНК-лигаза,** осуществляет «сшивание» свободных концов ДНК после образования «заплаты». Взаимодействует с другими белками, способствуя вырезанию окисленного основания ДНК и стимулируя APE1.		
Поли(*ADP*-рибозо) полимеразы(*PARP*)			
ADPRT 1q42	*PARP* осуществляет посттрасляционную модификацию ДНК и ключевых ферментов, участвующих в репарации и репликации ДНК.	Как триггер *BER* вносит существенный вклад в ответ клеток на генотоксичный стресс.	Расценивается как перспективная мишень для терапевтического воздействия при канцерогенезе. Широко изучаются ингибиторы *PARP*, начато изучение стимуляторов поли(*ADP*) рибозы.
ADPRTL2 14q11.2-q12	*PARP*-подобные ферменты.		
ADPRTL3 3p21.1-p22.2			
MGMT 10q26	Специализированный фермент, безошибочно удаляет алкил-радикал из 0^{6}-алкилгуанина.		Используется как мишень связывания для усиления терапевтического эффекта алкилирующих химиопрепаратов.

Национальная академия наук Беларуси

Гены репарации ДНК, локализация	**Продукты, их функции**	**Оценка онкориска**	**Мишень воздействия**
1	**2**	**3**	**4**
Эксцизионная репарации неправильно спаренных оснований (*mismatch repair*)			
MSH2 2p22-p21	Идентификация неправильно спаренного основания.	Повышает риск наследственного неполипозного колоректального рака (ННКРР). Поврежден в 45% случаев этого заболевания.	Гетерозиготное носительство имеет прогностическое значение. Полиморфизм по этим генам следует учитывать в программе лечения рака кишечника.
MSH3 5q11-q12			
MSH6 2p16			
MSH4 1p31	Гомологи MutS, специализированные для нужд мейоза. MutS кодирует белок, опознающий неспаренное основание.		
MSH5 6p21.3			
MLH1 3p21.3	Гомологи MutL Продукт MutL вступает в комплекс с продуктом MutS, способствуя его связыванию с неспаренным основанием.	Повышает риск ННКРР. Дефект в 49 % и 6% случаев, соответственно.	
PMS2 7p22			
Эксцизионная репарация нуклеотидов (*NER*)			
XPC 3p25	Обеспечивают связывание с ДНК, способствуют изменению конформации ДНК.	Указанные гены участвуют в глобальной геномной репарации (*GGNER*) на разных этапах. Гены ХР открыты при изучении молекулярных механизмов пигментной ксеродермы; ассоциированы со 100% раком кожи.	Стимуляция *NER* будет способствовать подавлению мутационного процесса и канцерогенеза в окружающей среде. В качестве одного из путей коррекции химио- и радиотерапии рака рекомендуется снижать эффективность этой репарационной системы в опухолевых клетках. Рекомендовано учитывать состояние *NER* при лечении немелкоклеточного рака легких.
XPA 9q22.3			
RPA1 17p13.3			
RPA2 1p35			
RPA3 7p22			
TFIIH комплекс	Катализирует расплетание нитей ДНК.		
XPB (ERCC3) 2q21	Включен в TFIIH комплекс, кодирует 3’→5’ДНК геликазу.		
XPD (ERCC2) 19q13.2-q13.3	Включен в TFIIH комплекс, кодирует 5’→3’ДНК геликазу.	Мутации в этих генах повышают риск канцерогенеза.	Одним из способов защиты здоровых тканей может быть активизация экспрессии генов *NER*.
XPG (ERCC5) 13q33	Осуществляет разрезание с 3’ конца.		
ERCC1 19q13.2-q13.3	Осуществляет разрезание с 5’ конца.		
XPF (ERCC4) 16p13.3-p13.13	Осуществляет разрезание с 5’ конца.		
CSA 5q12-q31	Мутации обуславливают синдром Кокейна. Продукты генов необходимы для *TCNER*, которая репарирует повреждения в транскрибируемых участках генома.		
CSB (ERCC6) 10q11			

Национальная академия наук Беларуси

Продолжение таблицы

Гены репарации ДНК, локализация	Продукты, их функции	Оценка онкориска	Мишень воздействия
1	**2**	**3**	**4**
Репарация двунитевых разрывов ДНК (*DSB DNA* repair)			
Гомологичная рекомбинация(*HR*)			
RAD51 15q15.1	Основной компонент гомологичной рекомбинации, катализирует ATM-зависимое гомологичное спаривание и реакцию переноса нити.	Мутации способствуют накоплению двунитевых разрывов ДНК и малигнизации клеток.	Полиморфизм по указанным генам имеет значение для ранней диагностики и прогноза лечения рака поджелудочной железы и др. форм рака.
RAD52 12p13-p12.2	Вспомогательный фактор рекомбинации.		
XRCC2 *7q36.1*	Члены семейства RecA/Rad51 белков, которые участвуют в гомологичной рекомбинации для поддержания стабильности генома. Вовлечены в репарацию разрывов и сшивок ДНК.	Гетерозиготное носительство мутаций повышает онкологический риск.	
XRCC3 14q32.3			
RAD50 5q31	АТРаза в комплексе с MRE11A и NBS1.	Синдром Ниймеген характеризуется хромосомной нестабильностью и склонностью к злокачественным заболеваниям крови.	
MRE11A 11q21	3’экзонуклеаза		
NBS1 8q21-q24	Мутация приводит к синдрому Ниймеген. Нормальный продукт, нибрин, регулирует работу комплекса. Mre11/ Rad50/ Nbs1.		
BRCA1 17q21	Дополнительный фактор транскрипции и рекомбинации	Высокий риск рака молочной железы и яичника.	Мутации в этих генах используются как биомаркеры предрасположенности к раку молочной железы. Состояние генов рекомендуется учитывать при лечении.
BRCA2 13q12.3	Существенный фактор, кооперируется с RAD51		
Воссоединение негомологичных концов (*NHEJ*)			
Ku70 22q13.2-q13.31	ДНК-связывающие белки, присоединяются к открытому концу нити ДНК; образуют комплекс с ДНК-зависимой протеинкиназой (DNA-PK).	Вместе с *PARP-1* и транскрипционным фактором C/EBPα обнаружены в опухолевых клетках простаты.	Экспрессия C/EBPα может увеличивать чувствительность опухоли к ДНК-повреждающим агентам.
Ku80 (XPCC5) 2q35			
XRCC4 5q13-q14	Функционирует в комплексе с ДНК- лигазой IV и DNA-PK. Осуществляет воссоединение негомологичных концов.	*NHEJ* нарушена при некоторых СХН. Мутации в генах XRCC4, XRCC5 повышают риск миеломы.	Системы *NHEJ* и *HR* рассматриваются как кандидаты для оценки риска возникновения, прогноза течения и коррекции лечения рака простаты.

Национальная академия наук Беларуси

Продолжение таблицы

Гены репарации ДНК, локализация	Продукты, их функции	Оценка онкориска	Мишень воздействия
1	2	3	4
Гены, дефектные при синдромах хромосомной нестабильности			
Анемия Фанкони			
FANCA 16q24.3	Участвуют в репарации сшивок ДНК, взаимодействуют с другими генами гомологичной рекомбинации. Существует FANC/BRCA путь репарации, устраняющий двунитевые разрывы ДНК. *FANCD1* идентична *BRCA2*. Известно о взаимодействии белков FANC с *BRCA1* и *BRCA2*, RAD51, NBS1, XPF/ERCC1, p53 и др. компонентами репарации ДНК.	Анемия Фанкони характеризуется повышенной чувствительностью хромосом к агентам, вызывающим сшивки ДНК, склонностью к злокачественной анемии и др. формам рака. Нарушение FANC/BRCA пути повышает риск рака молочной железы.	Полиморфизм по этим генам может быть использован в качестве биомаркера предрасположенности к раку.
FANCB			
FANCC *9q22.3*			
FANCD *3p26-p22*			
FANCE *6p21-p22*			
FANCF *11p15*			
FANCG (XRCC9); *9p13*			
Синдром Луи Бар (Ataxia telangiectasia)			
ATM 11q22-q23	Нормальный продукт — серин-треонин протеинкиназа — фосфорилирует ключевые белки клеточного ответа на DSB. Взаимодействует с NBS1, p53, BRCA1.	Для синдрома характерен лимфоидный рак. Гетерозиготное носительство повышает риск рака молочной железы.	Полиморфизм по этому гену указывает на риск канцерогенеза Обнаружение del(11q) влияет на прогноз и лечение хронического лимфолейкоза.
Синдромы преждевременного старения			
BLM 15q26.1	Синдром Блума. ДНК-геликаза участвует в *HR*.	Наблюдается предрасположенность к злокачественным заболеваниям.	ДНК-геликазы рассматриваются как перспективная терапевтическая мишень при раке (путем подавления их активности в опухолевых клетках).
WRN 8p12-p11.2	Синдром Вернера. ДНК-геликаза / 3'-экзонуклеаза) взаимодействует с Rad52, Ku-гетеродимером и DNA-PK комплексом; участвует в *NHEJ* и *HR*.		
REC-QL4	Синдром Ротмунд-Томпсона. Принадлежит к семейству RecQ геликаз, расплетает нити ДНК.	Высокий риск остеосаркомы.	

При составлении таблицы использованы материалы следующих публикаций [52, 68—77] и другие источники, указанные в списке литературы.

Инновационные подходы к диагностике, профилактике и лечению рака

В настоящее время развиваются новые концепции прогноза, диагностики, профилактики и лечения рака, базирующиеся на данных молекулярно-генетических исследований. Обнаружение мутаций в генах репарации ДНК может свидетельствовать о предрасположенности к онкологическим заболеваниям. Это продемонстрировано на примере генов *BRCA* и *ATM* относительно рака молочной железы [31, 32, 67], некоторых других генов по отношению к раку простаты [74] и т.д. Сейчас уже ясно, что выявление мутаций в генах репарации не только дает ценную информацию для онкологического прогноза, но и способно повлиять на ход лечения.

Как известно, противоопухолевая терапия основана на индукции сшивок и разрывов

Национальная академия наук Беларуси

ДНК, останавливающих репликацию и вызывающих гибель опухолевых клеток. С этой целью используется ионизирующее излучение и химические препараты с высокой гено- и цитотоксичностью. Однако результативность и эффективность лечения зависят от индивидуальных особенностей организма, определяющих чувствительность опухолевых и здоровых тканей к химио- и радиотерапии. Индивидуальная чувствительность в значительной мере обусловлена состоянием репарационных систем, поэтому полиморфизм по генам репарации ДНК следует учитывать в программе лечения. Такой подход предложен совсем недавно [75—77]. Предполагается, например, что состояние генов *BRCA1* и *BRCA2* следует использовать в качестве биомаркера для коррекции терапии рака молочной железы.

Другой подход подразумевает модификацию процесса репарации ДНК в опухолевых клетках. С этой целью предлагается использовать ингибиторы сигнальных молекул, формирующих клеточный ответ на ДНК-повреждающие факторы [78]. К числу сигнальных молекул относятся ДНК-зависимая протеинкиназа (*DNA-PK*), *ATM*-киназа, *check-point*-киназы и поли-*ADP*(рибозо)полимераза (*PARP*). Несколько лучше изучена *PARP*, которая осуществляет посттрансляционную модификацию ДНК и играет ключевую роль в поддержании целостности генома за счет инициации *BER* в ответ на индукцию однонитевых разрывов и окислительных повреждений ДНК [79—81]. К настоящему времени уже известны низкомолекулярные ингибиторы (такие как 3-аминобензамид, 1,5-дигидрооксиизохино-линон и недавно запатентованные триядерные бензимидазолы), применение которых позволит сфокусироваться на подавлении репарации разрывов ДНК [78, 82, 83].

Оба подхода являются инновационными. Пока они находятся в фазе концептуальной разработки, но ожидается, что их внедрение в практику позволит существенно повысить эффективность лечения онкологических заболеваний. Однако, необходимо иметь в виду другой аспект, а именно: любые способы противоопухолевой терапии оказывают неблагоприятные эффекты на здоровые ткани и являются небезразличными для организма. Отсюда следует необходимость защиты генома. Кроме того, защита генома от мутагенов окружающей среды является, по сути, единственной мерой предотвращения канцерогенеза на стадии его инициации. Изучение антимутагенеза и применение антимутагенов лежит в основе решения этой проблемы.

Антимутагены как антиканцерогены

Известно, что антимутагены являются эффективными антиканцерогенами, однако их влияние на молекулярно-биохимические процессы, критические для канцерогенеза, а тем более на экспрессию соответствующих генов, изучается сравнительно недавно. Имеющиеся данные обсуждались на VIII Международной конференции по механизмам антимутагенеза и антиканцерогенеза в Пизе (Италия, 2003) [84], а также нашли свое отражение в обзоре Р.И. Гончаровой и Т.Д. Кужир 2005 г. [85]. Обнаружено, что антимутагены выступают в роли перехватчиков свободных радикалов, подавляют систему метаболической активации ксенобиотиков и стимулируют их детоксикацию [86—89]. Они способны модулировать репарацию ДНК [90, 91], влиять на транскрипционные факторы и сигнальные пути, вовлеченные в регуляцию клеточного цикла и апоптоз [92—94]; подавляют воспаление и ангиогенез [95, 96]. В единичных работах показано, что эффекты антимутагенов опосредованы изменениями экспрессии генов, ответственных за те или иные защитные механизмы [97, 98]. Таким образом, подтвержден сделанный Р.И. Гончаровой еще в 90-е годы теоретический вывод о том, что антимутагены действуют как триггеры эндогенных защитных систем, влияя на экспрессию соответствующих генов [99, 100].

Характерной особенностью антимутагенов является их полифункциональность. Она свойственна фенольным компонентам зеленого чая (эпигаллокатехин галлат) и винограда (резвератрол), изотиоцианатам из крестоцветных овощей (сульфорафан и фенитилизотиоцианат), полисахариду генистеину [85]. Множественные механизмы действия антимутагенов подробно обсуждались нами ранее [15, 99]. С современных позиций этот феномен можно объяснить с точки зрения «интерференции генных сетей» [101]. Например, генная сеть редокс-регуляции, обеспечивающая адаптацию организма к окислительному

Национальная академия наук Беларуси

стрессу, объединяет через ключевые транскрипционные факторы локальные генные сети антиоксидантной защиты, регуляции клеточного цикла, апоптоза, ответа на тепловой шок, иммунного ответа. То есть, сигнал, единожды полученный через систему рецепторов, может распространяться в пределах одной или нескольких генных сетей, приводя к изменению экспрессии нескольких генов.

Представленный краткий обзор литературы убедительно показывает, что имеются все основания для успешного использования природных и синтетических антимутагенов/антиоксидантов как для предотвращения канцерогенеза, так и в качестве средств коррекции терапии рака на всех стадиях его развития. Однако, это предполагает дальнейшее детальное изучение молекулярных механизмов действия антимутагенов и оптимальных условий их применения на клеточном уровне.

Антимутагены дигидропиридинового ряда, их фармакологическая и генетическая характеристика в связи с антиоксидантными свойствами

1,4-дигидропиридин (1,4-ДГП) и его производные являются аналогами дигидроникотинамида, что предопределяет их участие в перехвате свободных радикалов, окислительно-восстановительных реакциях и перекисном окислении липидов (ПОЛ) [102]. Группа 1,4-дигидропиридинов привлекает внимание как потенциальный источник биологически активных веществ, представляющих интерес для фармакологии. В нашей лаборатории исследуются производные 1,4-ДГП, синтезированные в Латвийском институте органического синтеза, многие из которых обладают выраженной *фармакологической активностью*. Важной особенностью этих препаратов является их низкая токсичность: LD_{50} при инъекциях животным составляет 3000 мг/кг веса и более [102]. Известно о высокой антиоксидантной способности производных 1,4-ДГП [103, 104]. Установлено, что соединения этой серии проявляют мембраноактивные свойства [102], модулируют уровень кортикостериодных и других гормонов [105], реагируют с рецепторами глюкокортикоидов в клетках печени животных [106], оказывают иммунно- и геропротекторное действие [107]. Радиозащитные свойства большой группы производных 1,4-ДГП изучены по продолжительности жизни облученных животных и по клиническому проявлению местной реакции на облучение; показано, что некоторые из них, в частности, глутапирон и дилудин, являются эффективными радиопротекторами [108]. При хроническом облучении крыс установлено также антиканцерогенное действие глутапирона [109]. Обнаружение радиозащитной и антиканцерогенной активности у этих препаратов подтверждает перспективность их дальнейшего изучения в качестве средств профилактики и коррекции лечения рака.

При проверке *генетической активности* препаратов этой серии по отношению к спонтанным мутациям в половых клетках дрозофилы выявлено несколько антимутагенов, при этом установлена зависимость эффективности антимутагенного действия от химической структуры и антиоксидантной способности изученных соединений [15]. Эта зависимость объясняла эффекты антимутагенов против спонтанных мутаций, которые могли осуществляться путем перехвата эндогенных свободных радикалов. Она также позволяла предсказать радиозащитные свойства изученных производных 1,4-ДГП, поскольку хорошо известен вклад свободно-радикального компонента в радиационный мутагенез. Но дальнейшие исследования двух наиболее эффективных препаратов на дрозофиле и мышах продемонстрировали их способность защищать половые и соматические клетки от типичного алкилирующего агента этилметансульфоната (ЭМС) [10—12], что не связано с их антиоксидантными свойствами. Наоборот, все данные указывали, что механизм их действия опосредован защитными системами организма, в частности, репарацией ДНК [15].

Механизмы антимутагенного действия производных 1,4-ДГП, опосредованные репарацией ДНК и поли-(ADP)-рибозилированием

Предположение о модуляции этими препаратами репарационных процессов получило подтверждение снццчала в опытах на дрозофиле, затем на клетках человека.

Специальные подходы, а именно, изучение эффекта материнской репарации, исследование антимутагенов на стадиях сперматогенеза, резко

Национальная академия наук Беларуси

различающихся по репарационной способности, а также применение мутаген-чувствительных линий дрозофилы, обладающих тем или иным дефектом репарации, выявили следующее [15, 16]. Обработка самок антимутагенами способствовала подавлению ЭМС-индуцированного мутагенеза в сперматозоидах самцов. Антимутагенный эффект выявлен по отношению к точковым мутациям и летальным разрывам хромосом. В последнем случае он наблюдался в течение 14-ти дней хранения спермы у самок. Дефекты репарации, обусловленные мутациями *mei-9* и *mei-41*, уменьшали чувствительность ооцитов к антимутагенам.

Обработка антимутагенами личинок дрозофилы, которая в основном затрагивала премейотические стадии сперматогенеза, уменьшала уровень ЭМС-индуцированных летальных и нелетальных разрывов хромосом, а также точковых мутаций в сперматозоидах взрослых самцов. Дефекты в системах репарации снижали чувствительность мужских половых клеток к антимутагенам.

Предобработка антимутагеном взрослых самцов не влияла на химический мутагенез в сперматозоидах, но подавляла его в премейотических клетках. Дефект эксцизионной репарации также препятствовал реализации антимутагенного действия на этой стадии сперматогенеза.

Таким образом, антимутагенные эффекты изученных соединений проявлялись на фоне активизации репарационных процессов в половых клетках репарационно-компетентных особей, подтверждая предположение, что производные 1,4-ДГП способны модулировать репарацию ДНК.

В опытах *in vitro* с помощью щелочного гель электрофореза единичных клеток показано, что 0,1 и 0,01 μM препарата этой серии (шифр *AV-153*) способствует элиминации первичных повреждений ДНК, индуцированных ионизирующим излучением [17], при этом эффективность и скорость репарации ДНК наиболее существенно повышается в течение первых 30 мин после мутагенного воздействия. Интересно, что аналогичная картина наблюдалась и по отношению к ЭМС-индуцированным повреждениям ДНК, указывая на реализацию не столько антиоксидантного потенциала, сколько репарогенной активности изученного соединения. Необходимо подчеркнуть, что основная часть повреждений ДНК устранялась за первые полчаса после их индукции. Такая динамика соответствует скорости *BER* в облученных клетках [38].

Ранее нами рассмотрены некоторые возможные механизмы влияния антимутагенов дигидропиридинового ряда на репарацию ДНК, исходя из их аналогии дигидроникотинамиду, и высказана идея об их вмешательстве в биоэнергетические процессы и поли(*ADP*) рибозилирование [15]. Известно, что дигидроникотинамид представляет активный центр *NAD* (*NADP*). По современным представлениям, внутриклеточный баланс никотинамида и NAD^+ играет важнейшую роль в поддержании целостности генома и устойчивости клеток к стрессовым факторам среды, его сдвиг в ту или другую сторону влияет на метаболизм поли(*ADP*-рибозо)полимеразы [80, 110]. В свою очередь, *PARP* осуществляет посттрансляционную модификацию ДНК, от которой зависит экспрессия генов. Доказана роль *PARP* в поддержании целостности генома [80, 81]; установлено также, что геномная нестабильность, наблюдаемая в клетках животных и человека с нехваткой этого фермента, обусловлена нарушениями в системе эксцизионной репарации оснований [79].

Никотинамид служит эффективным ингибитором *PARP* [82]. Предположительно, производные 1,4-дигидропиридина, выступая, как и никотинамид, в качестве конкурентного субстрата, могут подавлять связывание *PARP* с NAD^+, препятствуя синтезу поли-*ADP*-рибозы. Поэтому следует ожидать, что при определенных условиях препараты этой серии будут индуцировать апоптоз. Однако, наряду с подавлением *PARP*, никотинамид способствует синтезу NAD^+, который в свою очередь, используется *PARP* как субстрат для синтеза поли-*ADP*-рибозы [79, 80]. Отсюда следует, что препараты дигидропиридинового ряда могут увеличивать выход поли-*ADP*-рибозы. В отличие от довольно широкого изучения ингибиторов *PARP*, проблема стимуляции поли-*ADP*-рибозилирования практически не исследована, за исключением данных по эпигаллокатехин галлату [93]. Эта идея получила развитие в работе Н.И. Рябоконь с соавторами, результаты которой только что опубликованы [111]. После обработки клеток лимфобластоидной линии *Raji* пероксидом

Национальная академия наук Беларуси

водорода изучена взаимосвязь между уровнем поли(*ADP*)рибозы, определяемой *in situ* иммунофлуоресценцией и с помощью Вестерн-блоттинга, и наличием повреждений ДНК, оцененных методом ДНК-комет. Показано 100-кратное увеличение содержания поли(*ADP*)рибозы в индивидуальных клетках в ответ на 100 μM H_2O_2 в течение 5 минут и его постепенное уменьшение к 15-й минуте после мутагенного воздействия, что отражает реакцию клеток на генотоксичный стресс. Этот процесс полностью подавлялся ингибитором *PARP NU1025*, тогда как в присутствии препарата *AV-153* в достаточно низких концентрациях (1 nM — 10 μM) наблюдалось зависимое от дозы увеличение уровня поли(*ADP*)рибозы до 130 %. Характерно, что именно эти дозы антимутагена способствовали репарации ДНК в предыдущем исследовании [17]. Таким образом, на примере данного препарата доказана способность антимутагенов дигидропиридинового ряда регулировать процесс поли(*ADP*)рибозилирования, который играет важную роль в защите генома и подавлении канцерогенеза.

Таким образом, группа антимутагенов, производных 1,4-ДГП, отличается низкой токсичностью, высокой антиоксидантной способностью и широким спектром фармакологической активности. Выявление у них репарогенной активности представляет большой теоретический и практический интерес, который обусловлен тем, что нарушения репарация ДНК вносят существенный вклад в развитие многих патологических состояний, включая канцерогенез. Дальнейшее исследование этих препаратов на различных клеточных моделях с выходом на молекулярные мишени, восприимчивые к их действию, будет способствовать продвижению препаратов этой серии в практику. Однако имеющиеся данные уже позволяют положительно оценить возможность их применения для предотвращения и оптимизации лечения рака.

Заключение

Представлен обзор литературы о роли репарации ДНК в канцерогенезе. Сведения о различных генах репарации в связи с оценкой онкологического риска систематизированы в таблице. Показано, что дефекты в системах репарации и даже гетерозиготное носительство соответствующих мутаций обуславливает предрасположенность к канцерогенезу и осложняет течение рака. Освещены новые подходы к оценке онкологического риска и терапии различных форм опухолей на основе выявления популяционного полиморфизма по генам репарации ДНК (*BRCA, ATM, hMSH2* и других). Обсуждается целесообразность изучения и применения антимутагенов в качестве антиканцерогенов. В частности, исследования последних лет свидетельствуют, что антимутагены влияют на клеточные процессы, вовлеченные в канцерогенез на разных стадиях его развития, и поэтому могут использоваться как для профилактики, так и для коррекции лечения рака. В связи с загрязнением окружающей среды мутагенными факторами увеличивается риск канцерогенеза, а повышение эффективности репарация ДНК может препятствовать этому процессу. Поэтому на стадии инициации рака репарационные системы являются одной из главных мишеней для превентивного действия антимутагенов. На стадиях промоции и прогрессии рака необходимо учитывать состояние репарационных систем, с тем, чтобы оптимизировать процесс лечения. Для подавления репарации ДНК в злокачественных клетках предлагается применять ингибиторы определенных сигнальных молекул. Для защиты здоровых тканей, также как и для ослабления воспалительной реакции, модификации апоптоза и подавления ангиогенеза могут быть использованы антимутагены, что представляет один из новых путей коррекции радио- и химиотерапии рака. Рассмотренные механизмы действия антимутагенов дигидропиридинового ряда, их высокая генопротекторная и репарогенная эффективность указывают на перспективность их применения в качестве антиканцерогенов.

Обзор подготовлен в рамках выполнения задания 02 по ГКПНИ «Биологическая инженерия и биобезопасность» и договора № Б07МС-017 с Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований.

Национальная академия наук Беларуси

Список использованных источников

1. Transgenerational mutation by radiation / Y.E. Dubrova [et al.] // Nature. — 2000. — Vol. 405. — P. 37.

2. Ryabokon, N.I. Genetic processes in chronically irradiated populations of small mammals / N.I. Ryabokon, I.I. Smolich., R.I. Goncharova // Environ. Management and Health. — 2000. — Vol. 11. — P. 433—446.

3. Ryabokon, N.I. Transgenerational accumulation of radiation damage in small mammals chronically exposed to Chernobyl fallout / N.I. Ryabokon, R.I. Goncharova // Radiat. Environ. Biophys. — 2006. — Vol. 45, № 3. — P. 167—177.

4. Воробцова, И.Е. Трансгенерационная передача радиационно-индуцированной нестабильности генома / И.Е. Воробцова, // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2006. — Т. 46, № 4. — С. 441—446.

5. Проблема индуцированной геномной нестабильности как основы повышенной заболеваемости у детей, подвергающихся низкоинтенсивному воздействию радиации в малых дозах / И.И. Сусков [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2006. — Т. 46, № 2. — С. 167—177.

6. Копнин, Б.П. Нестабильность генома и онкогенез / Б.П. Копнин // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 41, № 2. — С. 369—380.

7. Заридзе, Д.Г. Эпидемиология, механизмы канцерогенеза и профилактика рака / Д.Г. Заридзе // Материалы III съезда онкологов и радиологов СНГ, Минск, 25–28 мая 2004 г. / Минск, 2004. — Ч.1. — С. 31—36.

8. Stavric, B. Antimutagens and anticarcinogens in foods / B. Stavric // Food Chem. Toxicol. — 1994. — Vol. 32, № 1. — P. 79—90.

9. Ferguson, L.R. Studies on the role of specific dietary fibres in protection against colorectal cancer / L.R. Ferguson, P.J. Harris // Mutat. Res. — 1996. — Vol. 350, № 1. — P. 173—184.

10. Производные 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты (1,4-ДГИНК) — ингибиторы химического мутагенеза / Р.И. Гончарова [и др.] // Вестник РАМН. — 1995. — № 1. — С. 9—20.

11. Anticlastogenicity of two derivatives of 1,4-dihydroisonicotinic acid in mouse micronucleus test / R. Goncharova, [et al.] // Mutat. Res. — 2001. — Vol. 496. — P. 129–135.

12. Кластогенность этилметансульфоната и диметилтерефталата в микроядерном тесте и пути ее модификации / Р.И. Гончарова [и др.] // Цитология и генетика. — 2002. — №1. — С. 14–25.

13. Promising antimutagen for improving reproductive indices of stripped fishes and the quality of their progeny / R. Goncharova [et al.] // EAS Special Publication. — 2002. — №31. — P. 63—70.

14. Gupta, R.C. Background DNA damage from endogenous and unavoidable exogenous carcinogens: a basis for spontaneous cancer incidence? / R.C. Gupta, W.K Lutz // Mutat. Res.– 1999. — Vol. 424. — P. 1—8.

15. Кужир, Т.Д. Антимутагены и химический мутагенез в ситемах высших эукариот / Т.Д. Кужир. — Минск: Технология, 1999. — 267 с.

16. Модуляция процессов репарации ДНК на примере действия производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты / О.В. Даливеля [и др.] // Цитология и генетика.– 2005. — Т. 39, №5. — С. 62—72.

17. A 1,4-dihydropyridine derivative reduces DNA damage and stimulates DNA repair in human cell in vitro / N.I. Ryabokon [et al.] // Mutat. Res. — 2005. — Vol. 587. — P. 52—58.

18. Hanawalt, P.C. Understanding the role of global genomic DNA repair and transcription-coupled repair in relation to potential targets for anticarcinogenesis / P.C. Hanawalt // Proceedings of the Eighth International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis, Pisa, Italy, 4–8 Oct. 2003. — Pisa, 2003. — P. 57.

19. Basu, A.K. DNA damage: structural and functional consequences / A.K Basu, J.M. Essigmann // DNA Repair Mechanisms Impact on Human Diseases and Cancer / by ed. Jean-Michel H. Vos. — N.Y., Berlin, Heidelberg, Paris, 1995. — P. 1—24.

20. Wagner, J.R. Analysis of oxidative cytosine products in DNA exposed to ionizing radiation / J.R. Wagner // J. Chem. Phys. — 1994. — Vol. 91. — P. 1280—1286.

21. Riley, P.A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation / P.A. Riley // Int. J. Radiat. Biol. — 1994. — Vol. 65, № 1. — P. 27—33.

22. Ferritin heavy chain upregulation by NF-kB inhibits TNFα-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species / C.G. Pham [et al.] // Cell. — 2004. — Vol. 119. — P. 529—542.

Национальная академия наук Беларуси

23. Garg, A.K. Reactive oxygen intermediates in TNF signaling / A.K. Garg, B.B. Aggarwal // Mol. Immunol. — 2002. — Vol. 39. — P. 509—517.

24. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens / S. Bonassi [et al.] // Cancer Res. — 2000. — Vol. 60. — P. 1619—1625.

25. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans / S. Bonassi [et al.] // Carcinogenesis. — 2007. — Vol. 28, №3. — P. 625—631.

26. Chromosomal aberrations under basal conditions and after treatment with X-ray in human lymphocytes as related to the GSTM1 genotype / B. Karahalil [et al.] // Mutat. Res. — 2002. — Vol. 515, №1–2. — P. 135—140.

27. Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population / F. Marcon [et al.] // Mutat. Res. — 2003. — Vol. 541. — P. 1—8.

28. Wagner, R. Mismatch repair and human disease / R. Wagner, M. Radman. // DNA Repair Mechanisms Impact on Human Diseases and Cancer / by ed. Jean-Michel H. Vos. — N.Y., Berlin, Heidelberg, Paris, 1995. — P. 151—159.

29. Peltomдki, P. DNA mismatch repair and cancer / P. Peltomдki // Mutat. Res. — 2001. — Vol. 488. — P. 77—85.

30. Белев, Н.Ф. Роль генетических факторов в этиопатогенезе рака толстой кишки / Н.Ф. Белев // Материалы III съезда онкологов и радиологов СНГ, Минск, 25–28 мая 2004 г. / Минск, 2004. — Ч.1. — С. 64—68.

31. Tutt, A. The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition / A. Tutt, A. Ashworth // Trends Mol. Med. — 2002. — Vol. 8, № 12. — P. 571–576.

32. Turner, N. Targeting the DNA repair defect of BRCA tumors / N. Turner, A. Tutt, A. Ashworth // Curr. Opin. Farmacol. — 2005. — Vol. 5, № 4. — P. 388—393.

33. Expression of base excision DNA repair genes is a sensitive biomarker for in vivo detection of chemical-induced chronic oxidative stress: identification of the molecular source of radicals responsible for DNA damage by peroxisome proliferators / I. Rusyn I. [et al.] // Cancer Res. — 2004. — Vol. 64, № 3. — P. 1050—1057.

34. Sokhansanj, B.A. Estimating the effect of human base excision repair protein variants on the repair of oxidative DNA base damage / B.A. Sokhansanj, D.M. Wilson 3rd // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. — 2006. — Vol. 15, № 5. — P. 1000—1008.

35. David, S.S. Base-excision repair of oxidative DNA damage / S.S, David, V.L O'Shea, S. Kundu // Nature. — 2007. — Vol. 447, № 7147. — P. 941—950.

36. Teebor, G.W. Excision base repair / G.W. Teebor // DNA Repair Mechanisms Impact on Human Diseases and Cancer / by ed. Jean-Michel H. Vos. — N.Y., Berlin, Heidelberg, Paris, 1995. — P. 99—123.

37. Dizdaroglu, M. Substrate specificities and excision kinetics of DNA glycosylases involved in base-excision repair of oxidative DNA damage / M. Dizdaroglu // Mutat. Res. — 2003. — Vol. 531. — P. 119—126.

38. Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts / G. Dianov [et al.] // J. Bio. Chem. — 1998. — V. 273.– P. 33811—33816.

39. Sharma, R.A. Targeting base excision repair to improve cancer therapies / R.A. Sharma, G.L. Dianov G.L. // Mol. Aspects Med. — 2007. — Vol. 28, №3–4. — P. 345—374.

40. Hoeijmakers, J.H.J. Nucleotide excision repair: molecular and clinical implications / J.H.J. Hoeijmakers // DNA Repair Mechanisms Impact on Human Diseases and Cancer / by ed. Jean-Michel H. Vos. — N.Y., Berlin, Heidelberg, Paris, 1995. — P. 126—150.

41. De Boer, J. Nucleotide excision repair and human syndromes / J. De Boer, J.H.J. Hoeijmakers // Carcinogenesis. — 2000. — Vol. 21, №3. — P. 453—460.

42. Cleaver, J.E. Common pathways for ultraviolet skin carcinogenesis in the repair and replication defective groups of xeroderma pigmentosum / J.E. Cleaver // J. Dermatol. Sci. — 2000. — Vol. 23, № 1. — P. 1—11.

43. Leibeling, D. Nucleotide excision repair and cancer / D. Leibeling, P. Laspe, S. Emmert // J. Mol. Histol. — 2006. — Vol. 37, № 5-7. — P. 225—238.

44. Li, W. Double-stranded DNA breaks and gene functions in recombination and meiosis / W. Li, H. Ma // Cell Res. — 2006. — Vol. 16, № 5. — P. 402—412.

45. Keeney, S. Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation / S. Keeney, M.J. Neale // Biochem. Soc. Trans. — 2006. — Vol. 34, № 4. — P. 523—525.

Национальная академия наук Беларуси

46. Sjakste, N. Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation / N. Sjakste, T. Sjakste // Eur. J. Histochem. — 2007. — Vol. 51, № 2. — P. 81—94.

47. Pierce, A.J. Double-strand breaks and tumorigenesis / A.J. Pierce [et al.] // Trends Cell Biol. — 2001. — Vol. 11, №11. — P. 52—59.

48. Mills, K.D. The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis / K.D. Mills, D.O. Ferguson, F.W. Alt // Immunol. Rev. — 2003. — Vol. 194. — P. 77—95.

49. Downs, J.A. Chromatin structure and DNA double-strand break responses in cancer progression and therapy / J.A. Downs // Oncogene. — 2007. — Vol. 26, № 56. — P. 7765—7772.

50. Kanaar, R. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair / R. Kanaar, J.H. Hoeijmakers, D.C. van Gent // Trends Cell Biol. — 1998. — Vol. 8, №12. — P. 483—489.

51. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation / G. Iliakis [et al.] // Cytogenet. Genome Res. — 2004. — Vol. 104, № 1-4. — P. 14—20.

52. Королев, В.Г. Молекулярные механизмы репарации двунитевых разрывов ДНК у эукариот / В.Г. Королев // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2007. — Т. 47, № 4. — С. 389—401.

53. Thompson, L.H. Recombinational DNA repair and human disease / L.H. Thompson, D. Schild // Mutat. Res. — 2002. — Vol. 509, № 1-2. — P. 49—78.

54. De la Torre, C. Human syndromes with genomic instability and multiprotein machines that repair DNA double-strand breaks / C. De la Torre, J. Pinchera, J.F. Lopez-Saez // Histol. Hystopatol. — 2003. — Vol. 18, № 1. — P. 225—243.

55. Williams, R.S. Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template / R.S. Williams, J.S. Williams, J.A. Tainer // Biochem. Cell Biol. — 2007. — Vol. 85, № 4. — P. 509—520.

56. An inducible null mutant murine model of Nijmegen breakage syndrome proves the essential function of NBS1 in chromosomal stability and cell viability / I. Demuth [et al.] // Hum. Mol. Genet. — 2004. — Vol. 13, № 20. — P. 2385—2397.

57. Inducibility of nuclear Rad51 foci after DNA damage distinguishes all Fanconi complementation groups / B.C. Godhelp [et al.] // Mutat. Res. — 2006. — Vol. 594, № 1-2. — P. 39–48.

58. Kennedy, R.D. The Fanconi anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd / R.D. Kennedy, A.D. D'Andrea // Genes & Development. — 2005. — Vol. 19. — P. 2925—2940.

59. Genetic heterogeneity among Fanconi anemia heterozygotes and risk of cancer / M. Berwick [et al.] // Cancer Res. — 2007. — Vol. 67, № 19. — P. 9591—9596.

60. The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage / C. Morrison. [et al.] // EMBO J. — 2000. — Vol. 19, № 3. — P. 463—471.

61. Cann, K.L. Regulation of the cellular DNA double-strand break response / K.L Cann, G.G. Hicks // Biochem. Cell Biol. — 2007. — Vol. 85, № 6. — P. 663–674.

62. Taylor, A.M. Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD) — its clinical presentation and molecular basis / A.M. Taylor, A. Groom, P.J. Byrd // DNA Repair (Amst). — 2004. — Vol. 3, № 8–9. — P. 1219—1225.

63. Lavin, M.F. ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks / M.F. Lavin // Oncogene. — 2007. — Vol. 26, № 56. — P. 7749—7758.

64. Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation / F. Teyssier [et al.] // Bull. Cancer. — 1999. — Vol. 86, №4. — P. 345—357.

65. Bartek, J. DNA damage signaling guards against activated oncogenes and tumour progression / J. Bartek, J. Bartkova., J. Lukas // Oncogene. — 2007. — Vol. 26, № 56. — P. 7773–7779.

66. Bartek, J. DNA damage response as an anticancer barrier: damage threshold and the concept of 'conditional haploinsufficiency' / J. Bartek, J. Lukas, J. Bartkova // Cell Cycle. — 2007. — Vol. 6, № 19. — P. 2344–2347.

67. Characterization of the breast cancer associated ATM 7271T>G (V2424G) mutation by gene expression profiling / N. Waddell [et al.] // Genes Chromosomes Cancer. — 2006. — Vol. 45, № 12. — P. 1169—1181.

68. Human DNA repair genes / R.D. Wood [et al.] // Science. — 2001. — Vol. 291. P. 1284—1289.

69. Wood, R.D. Human DNA repair genes, 2005 / R.D. Wood, M. Mitchell, T. Lindahl // Mutat. Res. — 2005. — Vol. 577. — P. 275—283.

Национальная академия наук Беларуси

70. Ланцов, В.А. Репарация ДНК и канцерогенез: универсальные механизмы репарации у про- и эукариот и последствия их повреждения у человека / В.А. Ланцов // Мол. Биол. — 1998. — Т. 32, № 5. — С. 757—772.

71. Королев, В.Г. Эксцизионная репарация поврежденных оснований ДНК: ДНК-гликозилазы / В.Г. Королев // Генетика. — 2005. — Т.41, № 6. — С.725—735.

72. Королев, В.Г. Эксцизионная репарация поврежденных оснований ДНК: АП-эндонуклеазы и ДНК-полимеразы / В.Г. Королев // Генетика. — 2005. — Т.41, № 10. — С.1301–1309.

73. Томилин, Н.В. Репарация ДНК и ее роль в канцерогенезе // Материалы IX Российского онкологического конгресса, Москва, 20—22 ноября 2005 г. — режим доступа: http: //194.87.12.145/library/congress/09/21.htm.

74. Homologous recombination and prostate cancer: a model for novel DNA repair targets and therapies / R.G. Bristow [et al.] // Radiother. Oncol. — 2007. — Vol. 83, № 3. — P. 220—230.

75. Gossage, L. Cancer pharmaco-genomics: role of DNA repair genetic polymorphisms in individualizing cancer therapy / L. Gossage, S. Madhusudan // Mol. Diagn. Ther. — 2007. — Vol. 11, № 6. — P. 361—380.

76. Simon, G.R. Nuclear excision repair-based personalized therapy for non-small cell lung cancer: from hypothesis to reality / G.R. Simon, R. Ismail-Khan, G. Bepler // Int. J. Biochem. Cell Biol. — 2007. — Vol. 39, № 7-8. — P. 1318—1328.

77. BRCA1, a potential predictive biomarker in the treatment of breast cancer / C.R. James [et al.] // Oncologist. — 2007. — Vol. 12. — P. 142—150.

78. O'Connor, M.J. Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair / M.J. O'Connor, N.M. Martin, G.C. Smith // Oncogene. — 2007. — Vol. 26, № 56. — P. 7816—7824.

79. Shall, S. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? / S. Shall, G. de Murcia // Mutat. Res. — 2000. — Vol. 460. — P. 1—15.

80. Herceg, Z. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death / Z. Herceg, Z-Q Wang // Mutat. Res. — 2001. — Vol. 477. — P. 97—110.

81. Malanga, M. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network / M. Malanga, F.R. Althaus // Biochem. Cell Biol. — 2005. — Vol. 83, № 3. — P. 354—364.

82. Southan, G.J. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors / G.J. Southan, C. Szabo // Curr. Med. Chem. — 2003. — Vol. 10. — P. 321—340.

83. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors in cancer chemotherapy / V. Cepeda [et al.] // Recent Patents Anticancer Drug Discov. — 2006. — Vol. 1, № 1. — P. 39—53.

84. Proceeding of the Eighth International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis, Pisa, Italy, 4–8 Oct. 2003. — Pisa, 2003. —177 p.

85. Гончарова, Р.И. Молекулярные основы применения антимутагенов в качестве антиканцерогенов / Р.И. Гончарова, Т.Д. Кужир // Экологическая генетика. — 2005. — Т. 3, № 3. — С. 19–32.

86. Aruoma, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods / O.I. Aruoma // Mutat. Res. — 2003. — Vol. 523–524. — P. 9—20.

87. Development and application of test methods for the detection of dietary constituents which protect against heterocyclic aromatic amines / F. Kassie [et al.] // Mutat. Res. — 2003. — Vol. 523–524. — P. 183—192.

88. Cytochrome P450 1B1: a target for inhibition in anticarcinogenesis strategies / F.P. Guengerich [et al.] // Mutat. Res. — 2003. — Vol. 523–524. — P. 173—182.

89. Nijhoff, W.A. Induction of rat hepatic and intestinal glutathione-S-transferase and glutathione by dietary naturally-occurring anticarcinogens / W.A. Nijhoff, G.M. Groen, W.H.M. Peters // Int. J. Oncol. — 1993. — Vol. 3. — P. 1131—1139.

90. Vanillin (3-methoxy-4-hydroxy-benzaldehyde) inhibits mutation induced by hydrogen peroxide, *N*-methyl-*N*-nitroso-guanidine and mitomycin C but not ^{137}Cs γ-radiation at the *CD59* locus in human–hamster hybrid A_L cells / D.L. Gustafson [et al.] // Mutagenesis. — 2000. — Vol. 15. — P. 207—213.

91. Vasilieva, S. Para-aminobenzoic acid inhibits a set of SOS functions in *Escherichia coli* K12 / S. Vasilieva // Mutat. Res. — 2001. — Vol. 496. — P. 89—95.

92. Durant, S., Vanillines — a novel family of DNA-PK inhibitors / S. Durant, P. Karran // Nucleic Acids Res. — 2003. — Vol. 31. — P. 5501–5512.

93. Induction of poly(ADP-ribosyl)ation and DNA damage in human peripheral lymphocytes after treatment with (–)-epigallocatechin gallate /

Национальная академия наук Беларуси

B. Bertram [et al.] // Mutat. Res. — 2003. — Vol. 534. — P. 77—84.

94. Promotion versus suppression of rat colon carcinogenesis by chlorophyllin and chlorophyll: modulation of apoptosis, cell proliferation, and β-catenin/Tcf signaling / C.A. Blum [et al.] // Mutat. Res. — 2003. — Vol. 523–524. P. 217—223.

95. Mechanisms and applications of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprevention of cancer / V.E. Steele [et al.]. // Mutat. Res. — 2003. — Vol. 523–524. — P. 137—144.

96. Inhibition of VEGF (vascular endothelial growth factor)-induced angiogenesis by xanthorrhizol, a sesquiterpene isolated from Cucruma xhanthorrhiza / M.-J. Kim [et al.] // Proceedings of the Eighth International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis, Pisa, Italy, 4–8 Oct. 2003. — Pisa, 2003. — P. 72.

97. Modulation of gene expression by (–)-epigallocatechin gallate in PC-9 cells using a cDNA expression array / S. Okabe [et al.] // Biol. Pharmacol. Bull. — 2001. — Vol. 24. — P. 883—886.

98. Expression profiles of DNA repair genes in human lympho-blastoid cells exposed to (–)-epigallocatechin gallate / G. Werle-Schneider [et al.] // Proceedings of the Eighth International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis, Pisa, Italy, 4–8 Oct. 2003. — Pisa, 2003. — P. 157.

99. Гончарова, Р.И. Антимутагенез как генетический процесс / Р.И. Гончарова // Вестник РАМН. — 1993. — №1. — С. 26—33.

100. Гончарова, Р.И. Теоретические и практические аспекты антимутагенеза / Р.И. Гончарова // Современные проблемы генетики: сб. научных трудов Межд.унар. науч. конф., Минск, 17–18 ноября 2005 г. — Минск, 2005. — С. 21—25.

101. Степаненко, И.Л. Регуляция генных сетей стрессового ответа активными формами кислорода / И.Л. Степаненко // Экологическая генетика. — 2004. — Т. 2, № 1. — С. 4—12.

102. Дубур, Г.-Э.Я. 1,4-дигидропиридины, их реакционная способность и биологические свойства: автореф. дис. …док. хим. наук: 02.00.10 / Г.Э.Я. Дубур; Институт органического синтеза. — Рига, 1979. — 52 с.

103. Tirzitis, G. Antioxidation activity of 3,5-dicarbonyl derivatives of 2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine / G. Tirzitis, I. Kirule, G. Duburs // Fat Sci. Technol. — 1988. — Vol. 90. — P. 411—413.

104. Antioxidant activity of dihydropyridine derivatives / J. Pбnek [et al.] // Czech J. Food Sci. — 2000. — Vol. 18. — P. 144—145.

105. Influence of different types of the 1,4-dihydropyridine derivatives on rat plasma corticosterone levels / E. Liutkevičius [et al.] // Biomedical Letters —1999. — Vol. 60. — P. 39—46.

106. Study of interaction of 1,4-dihydropyridine derivatives with glucocorticoid hormone receptors from the rat liver / A. Vaitkuviene A. [et al.] // Pharmacol. Rep. — 2006. — Vol. 58, № 4. — P. 551—558.

107. Геропротекторная активность 2,6-диметил-3,5-диоксикарбонил-1,4-дигидропиридина / Н.М. Эмануэль [и др.] // Докл. Акад. Наук СССР. — 1998. — Т. 284. — С. 1271—1274.

108. Радиомодифицирующие свойства производных 1,4-дигидропиридина и 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-декагидроакридин-1,8-диона / Е.В Иванов [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2004. — Т. 44, №5. С. 550—559.

109. Антинеопластический эффект глутапирона при хроническом гамма-облучении крыс / Л.П. Вартанян [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2004. — Т. 44, № 2. — С. 198–201.

110. Zhang, J. Are poly(ADP-ribosyl)ation by PARP–1 and deacetylation by Sir2 linked? / J. Zhang // Bioessays.– 2003.– Vol.25.–P.1—7.

111. Changes in poly(ADP-ribose) level modulate the kinetics of DNA strand break rejoining / N.I. Ryabokon [et al.] // Mutat Res. 2008. — Vol. 637, № 1-2.– P. 173—181.

Дата поступления статьи 17 апреля 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 577.175.5

К.А. Фроленков, Н.С. Фролова, Е.В. Рудая, В.М. Шкуматов

ВЛИЯНИЕ ТЕТРАЗОЛОВ НА ВЗАИМООТНОШЕНИЕ 17α-ГИДРОКСИЛАЗНОЙ И 20(α, β)-ГИДРОКСИСТЕРОИД-ДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТЕЙ В РЕКОМБИНАНТНЫХ ДРОЖЖАХ, ТРАНСФОРМИРУЮЩИХ СТЕРОИДЫ

Учреждение Белорусского Государственного Университета
«Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»
Республика Беларусь, 220050, г. Минск, ул. Ленинградская, 14

Введение

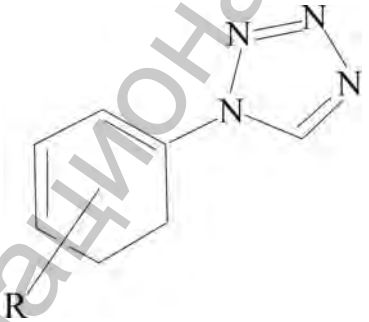
Цитохром P450c17 является ключевым ферментом биосинтеза стероидов и, в частности, андрогенов [1,2]. Терапия рака предстательной железы предполагает использование препаратов, понижающих биосинтез половых гормонов — антиандрогенов, большинство из которых является ингибиторами P450c17 [3]. Таким образом, P450c17 является фармакологической мишенью для селективного ингибирования с целью терапии ряда андроген-положительных заболеваний (рак простаты). Рекомбинантные бактерии и дрожжи, в которых осуществляется экспрессия P450c17 и проявляется его функциональная активность, являются новым типом клеточных тест-систем для скрининга соединений, способных ингибировать P450c17.

Вычислительные методы стали важным компонентом многих этапов разработки лекарственных препаратов, от идентификации активных соединений, до оптимизации соединений-лидеров [4—6]. В том случае, когда структура целевого белка доступна, появляется возможность использовать докинг, как инструмент выявления потенциальных соединений для воздействия на данный белок. Кроме того, докинг может также проводиться для анализа возможных путей метаболизма препарата, используя структуры ферментов I и II фазы дезактивации, например, таких как цитохромы P450 [7,8].

В настоящей работе с использованием рекомбинантных дрожжей *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117α была тестирована способность ряда синтетических арилтетразолов ингибировать гетерологично экспрессированный цитохром P450c17.

Материалы и методы

В работе исследовались следующие производные арилтетразолов (Рис. 1):



R=1.3-OH **A1**
2.4-OH **A3**
3.4-OEt **A4**
4.3-OBz **A2**

Рис. 1. Структуры исследуемых арилтетразолов: A1 — 1-(3-гидроксифенил)-1H-тетразол; A2 — 1-(3-бензилоксифенил)-1H-тетразол; A3 — 1-(4-гидроксифенил)-1H-тетразол; A4 — 1-(4-этоксифенил)-1H-тетразол.

Национальная академия наук Беларуси

Биотрансформация прогестерона рекомбинантными микроорганизмами в присутствии модификаторов биосинтеза стероидов.

К индуцированным D-галактозой клеткам *S. cerevisiae GRF18/YEp5117α* добавляли модификаторы в концентрации 20-100 μM и через 2 часа прогестерон в концентрации 50 μM. Параллельно с этим проводился контрольный опыт, в котором вместо раствора модификатора добавлялось эквивалентное количество этанола. Биотрансформацию осуществляли в колбах емкостью 100 мл при 28—29°С, 200 об/мин на термостатируемом шейкере. Пробы отбирали во временном диапазоне 0—6 ч по 1,5 мл. Все пробы экстрагировали этилацетатом 3×2 мл, экстракты отделяли центрифугированием и выпаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 300 μл этанола и анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). ВЭЖХ проводили на хроматографической системе LC-10AT («Shimadzu», Япония). Для регистрации использовали УФ-детектор с диодной матрицей SPD-M10A. Процесс хроматографии и его обработку осуществляли с помощью программного обеспечения CLASS-VP («Shimadzu»).

Молекулярное моделирование и докинг.

В работе использовалось программное обеспечение: UCSF Chimera (University of California); AutodockTools (Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute); ArgusLab (Mark Thomson and Planaria Software LLC).

Результаты и обсуждение

На рисунке 2 представлены хроматограммы, иллюстрирующие изменение концентрации стероидных продуктов во внеклеточной среде при биотрансформации прогестерона рекомбинантными дрожжами *S. cerevisiae GRF18/YEp5117α* (контроль) (А) и с предварительным добавлением А2 (В). На начальных этапах биотрансформации все соединения уменьшали начальную скорость образования 17α-гидроксипрогестерона в 1,2—3 раза. ВЭЖХ анализ продуктов превращения прогестерона на фоне предварительного действия А2, что свидетельствует о частичном ингибировании реакции 17α-гидроксилирования. Анализ кинетики поглощения и биотрансформации прогестерона совместно с арилтетразолами, показал, что при концентрациях 10-100 μM равновесие наступает в течение 2-х часов. Установлено, что исследованные арилтетразолы уменьшают скорость образования 17α-гидроксипрогестерона, действуя как ингибиторы цитохрома Р450с17.

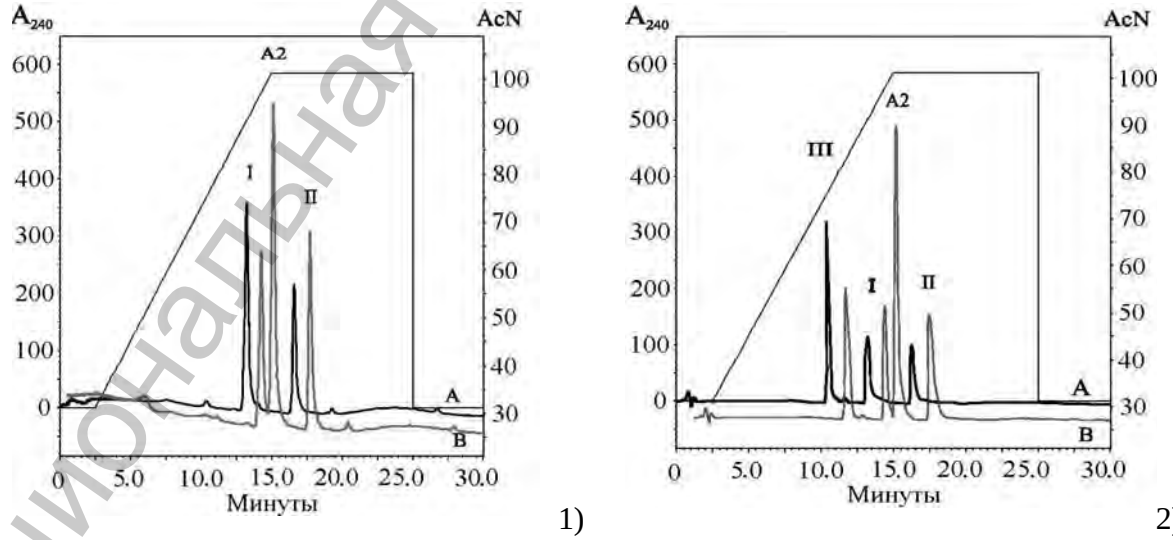


Рис. 2. ВЭЖХ анализ начального (1) и конечного (2) этапа трансформации прогестерона в дрожжах *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117α. А — контроль, В — с добавлением ингибитора. I — 17α-гидроксипрогестерон; II — прогестерон; III — 17α,20α-дигидроксипрегн-4-ен-3-он ; А2 — ингибитор.

Национальная академия наук Беларуси

Снижение скорости образования диола в опыте с исследуемыми соединениями (Рис. 2 (2)) происходит не вследствие прямого ингибировании реакции 20α-восстановления, а является результатом уменьшения скорости образования 17α-гидроксипрогестерона. Основным предположением, на котором базируется выбор тетразольного фрагмента как фармакофора, является возможность связывания его с железом гемовой группы в качестве 6-го лиганда. Вычислительными методами показана принципиальная возможность протекания процесса комплексообразования в молекуле фермента (Рис.3).

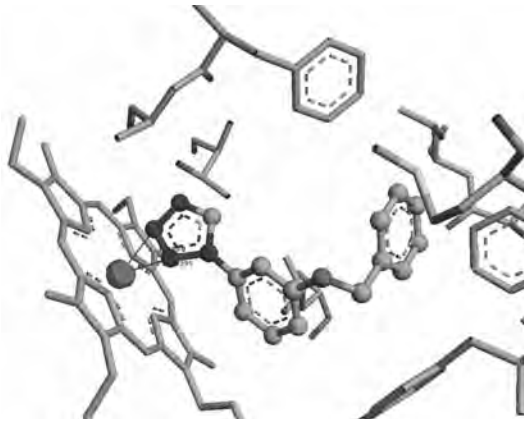


Рис. 3. Положение А2 в активном центре фермента Р450с17, рассчитанное при помощи программы Arguslab. А2 показан в виде шариковой модели, атом Fe гемма изображен голубым шариком, атомы N молекулы А2 показаны синими шариками.

Используя программы Autodock 4.0 были получены следующие данные по докингу соединений, содержащих в своем составе азольный фрагмент (Табл.1).

Таблица 1

Данные по докингу соединений, содержащих азольный фрагмент; * K_{dis} — константа диссоциации комплекса, ** $E_{связ}$ — энергия связывания

Соединение	*K_{dis}, μM	**$E_{связ}$, ккал\моль
1-метилимидазол	2410	-3,57
1-метилтетразол	1770	-3,75
А2	18,3	-6,46
Кетоконазол	16,22	-6,53
А1	36,6	-6,05

Заключение

Используя рекомбинантные микроорганизмы и вычислительные методы исследования получены результаты, показывающие перспективность использования тетразолов в качестве фармакофора для создания соединений — потенциальных ингибиторов цитохрома Р450с17.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГКПНИ «Биологическая инженерия и биобезопасность» (№ 20065288) и INTAS (CA-03-51-4366).

Национальная академия наук Беларуси

Список использованных источников

1. Leroux, F. Inhibition of p450 17 as a new strategy for the treatment of prostate cancer / F. Leroux // Curr. Med. Chem. — 2005. — № 12. — P. 1623—1629.

2. Cytochrome P-450 dependent pathways in corticosteroid hormones biosynthesis/ V.M. Shkumatov [et al.] // Pharmazie. — 1985. — V. 40, № 11. — P. 757—766.

3. Inhibitors of enzymes of androgen biosynthesis: cytochrome P450 (17) alphand 5 alpha-steroid reductase / M. Jarman [et al.] // Natural Prod. Rep. — 1998. — P. 495—512

4. Bajorath, J. Integration of virtual and high-throughput screening/ J. Bajorath // Nature Rev. Drug Discov. — 2002. — № 1. — P. 882—894

5. Walters, W.P. Can we learn to distinguish between «drug-like» and «nondrug-like» molecules? / W.P. Walters, A. Ajay, M.A. Murcko // J. Med. Chem. — 1998. — V. 41, № 18. — P. 3314-3324

6. Langer, T. Virtual screening: an effective tool for lead structure discovery? / T. Langer, R.D. Hoffmann // Curr. Pharm. Design. — 2001. — № 7. — P. 509—527

7. Homology modeling of rat and human cytochrome P450 2D (CYP2D) isoforms and computational rationalization of experimental ligand–binding specificities/ J. Venhorst [et al.] // J. Med. Chem. — 2003. — № 46. — P. 74—86

8. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin/ P.A. Williams [et al.] // Nature. — 2003. — № 424. — P. 464—468

Дата поступления статьи 9 апреля 2008 г

Национальная академия наук Беларуси

УДК 577.175.5

Я.В. Фалетров, Н.С. Фролова, Е.В. Рудая, В.Г. Радюк, В.М. Шкуматов

ПОДАВЛЕНИЕ 3β-О-АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ПРЕГНЕНОЛОНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В РЕКОМБИНАНТНЫХ ДРОЖЖАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* GRF18/YE$_p$5117α АЛИФАТИЧЕСКИМИ СПИРТАМИ

Учреждение Белорусского Государственного Университета
«Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»
Республика Беларусь, 220050, г. Минск, ул. Ленинградская, 14

Введение

Цитохром P450c17 (17α-гидроксилаза, 17, 20-лиаза, CYP17A1) является ключевым ферментом биосинтеза 17α-гидроксистероидов и андрогенов. Рекомбинантные дрожжи, экспрессирующие ферменты биотрансформации стероидных гормонов млекопитающих, в частности, цитохромы P450, исследуются как новый тип биокатализаторов для направленного синтеза стероидов [1]. Предпочтительный выбор дрожжей *Saccharomices cerevisiae* по сравнению с бактериями *Escherichia coli* обусловлен рядом преимуществ и, в частности, наличием конститутивной цитохром P450-редуктазы [2]. На основе дрожжей *S. cerevisiae* была осуществлена экспрессия большинства ферментов биосинтеза стероидных гормонов млекопитающих и реализована их активность *in vivo*, создан биокатализатор для синтеза кортизола из простых источников углерода [1]. Рекомбинантные дрожжи и бактерии, экспрессирующие P450c17, также используются как тест-системы для скрининга селективных ингибиторов P450c17 — потенциальных антиандрогенных лекарств [3, 4]. Вместе с тем, ряд процессов, катализируемых собственными ферментами *S.cerevisiae*, таких как 20α-кетовосстановление 17α-гидроксипрегнанов [5], 17β-кетовосстановление 17-кетоандрогенов, мешают количественному превращению стероидов по путям, катализируемым встроенными ферментами. В случае прегненолона и ряда 3β-гидроксистероидов к отмеченным выше побочным процессам добавляется 3β-О-ацетилирование [6]. Исследование метаболизма прегненолона и других 3β-гидрокси-Δ^5-стероидов в таких рекомбинантных дрожжах представляет значительный интерес, поскольку прегненолон синтезируется из холестерина посредством ферментной системы отщепления боковой цепи холестерина и является предшественником всех стероидных гормонов [7] и, в частности, первичного андрогена — дегидроэпиандростерона [8].

Белки ATF2p и ATFp1 (степень гомологии 37 % [6]) катализируют образование ацетиловых эфиров изоамилового и ряда других алифатических спиртов в *S. cerevisiae* [9, 10]. Цель настоящей работы заключалась в использовании ряда алифатических спиртов в качестве конкурентных субстратов для ATF2p для соответствующего уменьшения ацетилирования прегненолона и его производных в рекомбинантных дрожжах *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117α.

Материалы и методы

Получение 3-ацетил-производных прегненолона и 17-гидроксипрегненолона осуществлялось путем добавления к толуольному раствору стероидов уксусного ангидрида в пиридине

Национальная академия наук Беларуси

(3/2) с последующим перемешиванием при 25° С в течение нескольких часов.

Наработку биомассы, индукцию и хранение неиндуцированных и индуцированных клеток *S. cerevisiae* GRF 18/YEp5117α, несущих встроенный ген *CYP17* под контролем промотора *GAL10* проводили согласно [3, 5]. Биотрансформацию прегненолона и 17α-гидроксипрегненолона клетками *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117α в присутствии алифатических спиртов осуществляли в среде YPD (OD_{600} 10). Одновременно добавляли растворы стероидов в этаноле и исследуемый алифатический спирт; в контроль добавляли аликвоту этанола. Общая начальная концентрация спиртов — не более 1,0 %. Пробы отбирали во временном диапазоне 0—6 ч по 1,5 мл. Клетки разрушали методом замораживания-оттаивания (4 цикла, от —15°С до +5°С). Все пробы экстрагировали этилацетатом 3×2 мл, экстракты отделяли центрифугированием и выпаривали досуха. Анализ проб проводился методом газожидкостной хроматографии на хроматографе GC-17A(Shimadzu, Япония) с пламенно-ионизационным детектором. Использовали колонку RTX1 (Restek) (L 3м; d 3,2мм; f 0,5ум) и N_2 как газ-носитель, скорость потока 1,1 мл/мин.

Результаты и обсуждение

Установлено, что прегненолон за 4 ч практически полностью превращался в прегненолона 3-О-ацетат. Добавление в среду для культивирования изоамилового спирта до 0,5 % практически полностью подавляет ацетилирование прегненолона. После 4 ч биотрансформации соотношение соответствующих ацетата и субстрата уменьшалось до 0,11 по сравнению с контролем 0,87, т.е. приблизительно в 8 раз (Рис. 1).

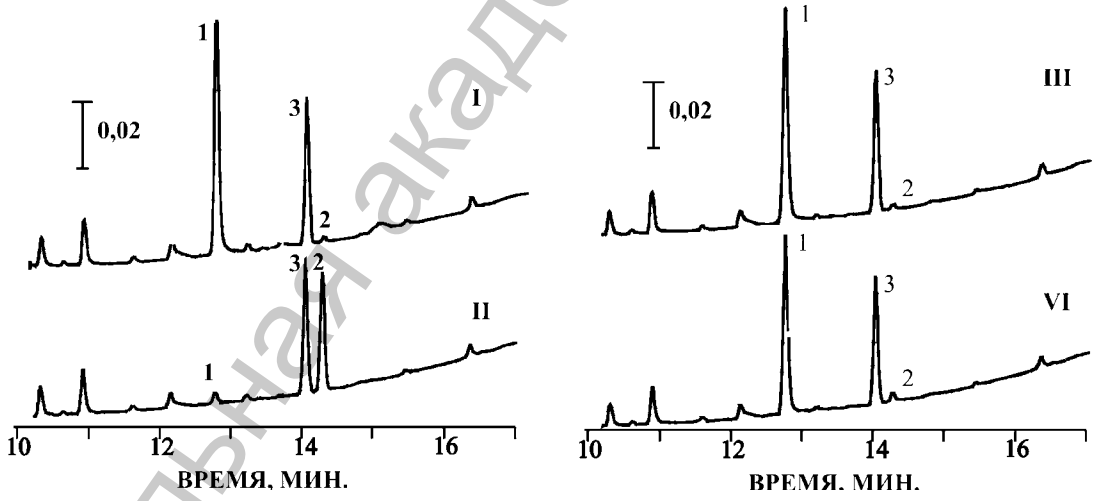


Рис. 1. ГЖХ анализ биотрансформации прегненолона неиндуцированными клетками *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117α. I и II — контрольный опыт, 0 и 4 ч соответственно; III и IV — с добавкой изоамилового спирта до 0,5 % об., 0 и 4 ч соответственно. 1 — прегненолон (tr 12,6), 2 — прегненолона 3 О ацетат (tr 14,1), 3 — прогестерон (tr 13,8) — внутренний стандарт, свидетельствующий об отсутствии Р450с17 в клетках).

Сравнение кинетических характеристик превращения прогестерона и прегненолона Р450с17 *in vitro* [9] с данными по биотрансформации прогестерона клетками *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117α [5] показывает, что 4—6 ч достаточно для полного превращения прегненолона по пути 17α-гидроксилирования. Определено влияние добавки изоамилового спирта на соотношение реакций 17α-гидроксилирования и 3-О-ацетилирования в индуцированных клетках *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117α (Рис. 2).

Национальная академия наук Беларуси

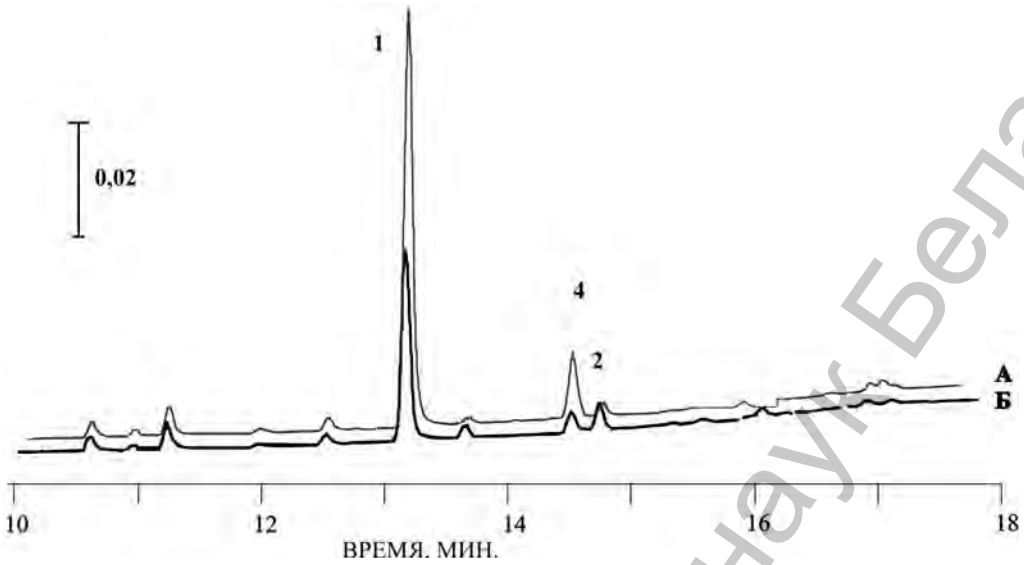


Рис. 2. Газохроматографический анализ проб 2 ч биотрансформации прегненолона индуцированными дрожжами *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117α на среде YPD как описано в «Материалы и методы». **А** (тонкая линия) —контроль, **Б** (жирная линия) — с добавкой 0,5 % изоамилового спирта; 1 — прегненолон, 2 — 17α-гидроксипрегненолона 3-О-ацетат, 4 — 17α-гидроксипрегненолон.

Меньший эффект подавления изоамиловым спиртом ацетилирования прегненолона в индуцированных клетках *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117α обусловлен повышением скорости потребления внутриклеточного кислорода на среде с относительно большим содержанием глюкозы, соответственно сильных репрессора и индуктора *ATF1* (*ATF2*) [10].

Заключение

Таким образом, использование дешевых алифатических спиртов позволило уменьшить степень тупикового метаболизма стероидов, частично исключая необходимость трудоемких и дорогостоящих операций разрушения гена *ATF2*. Данный метод можно использовать для осуществления направленного синтеза стероидов. Также, при подавлении ацетилирования 17α-гидроксипрегненолона становиться возможным реализация одностадийного тестирования влияния соединений сразу на две биологические мишени в патологии андроген-зависимых заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГКПНИ «Биологическая инженерия и биобезопасность» (№ 20065288) и INTAS (CA-03-51-4366).

Список использованных источников

1. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast / F. M. Szczebara [et al.] // Nature. Biotechnol. — 2003. — V. 21, № 2. — P. 143—149.

2. Expression of bovine cytochrome P450c17 cDNA in *Saccharomyces cerevisiae* / T. Sakaki [et al.] // DNA. — 1989. — V. 8, № 6. — P. 409—418.

3. Влияние модификаторов биосинтеза стероидов на биотрансформацию прогестерона рекомбинантными микроорганизмами экспрессирующими цитохром Р450с17 / В.М. Шкуматов [и др.] // Прикл. биохимия и микробиол. — 2006. — Т. 52, № 3. — С. 298—308.

4. Ehmer, P.B. Development of a simple and rapid assay for the evaluation of inhibitors of human 17al-

Национальная академия наук Беларуси

pha-hydroxylase-C(17,20)-lyase (P450cl7) by co-expression of P450c17 with NADPH-cytochrome-P450-reductase in *Escherichia coli*/ P. B. Ehmer, J. Jose, R.W. Hartmann // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 2000. — V. 75, № 1. — P. 57—63.

5. Biotransformation of steroids by a recombinant yeast strain expressing bovine cytochrome P45017 / V. M. Shkumatov [et al.] // Biochemistry (Moscow). — 2002. — V. 67, № 4. — P. 547—560.

6. Pregnenolone esterification in Saccharomyces cerevisiae. A potential detoxification mechanism / G. Cauet [et al.] // Eur. J. Biochem. — 1999. — V. 261, № 1. — P. 317—324.

7. Cytochrome P-450 dependent pathways in corticosteroid hormones biosynthesis/ V.M. Shkumatov [et al.] // Pharmazie. — 1985. — V. 40, № 11. — P. 757—766

8. Soucy, P. Conversion of pregnenolone to DHEA by human 17alpha-hydroxylase/17, 20-lyase (P450c17). Evidence that DHEA is produced from the released intermediate, 17alpha-hydroxypregnenolone / P. Soucy, V. Luu-The // Eur. J. Biochem. — 2000. — V. 267, № 11. — P. 3243—3247.

9. Production of isoamyl acetate in ackA-pta and/or ldh mutants of *Escherichia coli* with over-expression of yeast ATF2 / R. V. Vadali [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2004. — V. 63, № 6. — P. 698—704

10. Effect of Aeration and Unsaturated Fatty Acids on Expression of the Saccharomyces cerevisiae Alcohol Acetyltransferase Gene / T.Fujii [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 1997. — V. 63, № 3. — P. 910—915.

Дата поступления статьи 9 апреля 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 575.224. 6: 577.346

О.В. Даливеля[1], Н.В. Савина [2], Т.Д. Кужир [2], И. Бурачевска [3], М. Воеводска [3]

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПОД ВЛИЯНИЕМ АНТИМУТАГЕНА ДИГИДРОПИРИДИНОВОГО РЯДА

[1]Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка
Республика Беларусь, 220050, г. Минск, ул. Советская. 18
[2]ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220020, г. Минск, ул. Академическая 27,
[3]Институт ядерной химии и технологии
ул. Дородна, 16 Dorodna 16, PL-03-195 Warsaw, Poland

Введение

Современная стратегия прогноза, профилактики, ранней диагностики и лечения различных, в том числе злокачественных, заболеваний базируется на изучении молекулярных механизмов, вовлеченных в их этиологию и патогенез. В некоторых случаях нарушения, происходящие на молекулярном уровне, инициируют патологические процессы, в других — сопутствуют или осложняют их. Известна роль повреждений ДНК и нарушений репарации ДНК в канцерогенезе и другой патологии. В связи с этим большое внимание уделяется скринингу и изучению антимутагенов. На современном этапе антимутагены рассматриваются как ингибиторы мутагенеза и канцерогенеза, средства, улучшающие качество жизни, индукторы защитных систем, модуляторы молекулярных процессов и генов, ответственных за клеточный ответ на генотоксичный стресс [1, 2]. Это предопределяет целесообразность использования антимутагенов как средств превентивного и терапевтического воздействия при многих хронических заболеваниях, включая рак.

Ранее среди синтетических производных 1,4-дигидропиридина (1,4-ДГП) обнаружен ряд антимутагенов [3]. Модельные эксперименты на различных тест-системах *in vivo* показали, что эффективность антимутагенного действия против спонтанных мутаций в половых клетках соответствует антиоксидантной активности изученных соединений, а защитные эффекты против химических мутагенов в половых и соматических клетках обусловлены запуском систем детоксикации ксенобиотиков в организме и/или влиянием на репарацию ДНК [3, 4]. Последнее нашло подтверждение в исследованиях на клетках человека *in vitro* [5]. Выявление уникальной способности предотвращать спонтанные мутации, а также модулировать репарационные процессы при химическом и радиационном мутагенезе позволяет рассматривать препараты этой серии как перспективные антиканцерогены. Для развития этой идеи, а также для последующего внедрения изучаемых препаратов в практику необходимо более детальное исследование механизмов их действия на клеточных моделях.

Одной из важнейших проблем, имеющих практическое значение для онкологии, является изменение таких характеристик как жизнеспособность, рост и пролиферативная активность клеток. Целью данной работы было изучение влияния одного из производных 1,4-ДГП на эти показатели с использованием различных культивируемых линий клеток млекопитающих.

Материалы и методы

В качестве *модулятора клеточных процессов* исследован одноядерный препарат дигидропиридинового ряда — натрий 3,5-бис-этоксикарбонил-2,6-диметил-1,4-

Национальная академия наук Беларуси

дигидропиридин-4-карбоксилат, синтезированный в лаборатории мембраноактивных соединений и β-дикетонов Латвийского Института органического синтеза и любезно предоставленный академиком Г. Дубуром. Препарат (ДГП) применялся в диапазоне доз 10^{-4} — 10^{-9} М. Его действие изучали в облученных и необлученных клетках. Антимутаген добавлялся в клеточную суспензию за час до облучения. Отмывка прапаратов после облучения не проводилась. Облучение проводили с помощью исследовательской кобальтовой пушки ANDREX (Holger Andreasen, Denmark, 200 kVp, 5 мА, 1.2 Гр/мин). Для разных объектов исследования были подобраны биологически эквивалентные дозы.

Объекты исследования: сублинии лимфомы мыши *L5178Y* (*LY-R* и *LY-S*), культура клеток китайского хомячка *CHO* и *xrs-6*. Обе пары клеточных линий различаются по чувствительности к мутагенным факторам вследствие дефектов репарации двунитевых разрывов ДНК в сублинии *LY-S* и *xrs-6*, что в свою очередь связано с нарушением разных сигнальных путей [6, 7]. В сублинии *LY-S* изменен метаболизм поли(ADP)рибозы, что не характерно для *xrs-6*. В качестве *негативного контроля* исследовали необработанные клетки, в качестве *позитивного контроля* оценивали действие ионизирующей радиации на все исследуемые линии.

Анализ *выживаемости клеток* сублиний *L5178Y* проводили с помощью прижизненной окраски трипановым синим клеточной суспензии после 48-часового культивирования. Частоту погибших клеток оценивали по процентному отношению окрашенных в голубой цвет клеток к количеству всех просчитанных. *Относительную выживаемость клеток* анализировали по соотношению количества выживших клеток в опытных вариантах и контроле. Для оценки *пролиферативной активности* клеток учитывали 1) индекс ядерного деления (*NDI*) и частоту двуядерных клеток (*BN*) после обработки клеточных суспензий сублиний *L5178Y* цитохалазином; 2) клонообразующую способность клеток *CHO* и *xrs6*, при этом, подсчет колоний осуществляли через 3-е суток после посева клеток на чашки Петри. Эффективность клонообразования оценивали по процентному отношению количества колоний к количеству посеянных клеток. Для оценки *NDI* и *BN* отбор образцов проводили через 16 или 24 часа. *NDI* рассчитывали по формуле:

$$NDI= (1M_1+2M_2+3M_3+4M_4+5M_5)/N,$$

где M_1, M_2, M_3, M_4. — количество клеток, имеющих одно, два и т.д. ядер;

M_5 — количество клеток, имеющих более 4-х ядер;

N — 500 клеток, просчитанных на каждом стекле.

Кроме того, исследовали влияние антимутагена дигидропиридинового ряда на выживаемость и рост клеток сублинии *LY-R* в зависимости от активности ATM-киназы. В этих экспериментах использовали эффективный ингибитор этой сигнальной молекулы — кофеин [8, 9]. Эксперименты выполняли по следующей схеме: 1) обработка клеточной суспензии кофеином (Кф) в дозе 2 мМ, либо ДГП при концентрации 1нМ, либо Кф + ДГП; 2) облучение в дозе 2 Гр; 48-часовое культивирование клеток. При изучении модификации сигнального пути клеточного ответа на радиацию клетки за час до облучения обрабатывались кофеином, ДГП, или Кф + ДГП. Через 48 часов после обработки проводился тест с трипановым синим и подсчет клеток в камере Бюркера.

Результаты представляют средние значения не менее трех повторностей; статистическая обработка данных проводилась с помощью стандартного пакета программ Microsoft Excel-2000. Достоверность различий между вариантами опытов определяли по критериям *t* Стьюдента и χ^2.

Результаты и обсуждение

Жизнеспособность и рост клеток лимфомы мыши. Предварительные данные, опубликованные ранее [10, 11], свидетельствовали о том, что выбранный антимутаген дигидропиридинового ряда снижает как спонтанную, так и вызванную облучением частоту мертвых клеток в сублиниях лимфомы мыши. Дальнейшие исследования подтвердили антицитотоксические свойства ДГП, которые в большей степени проявлялись по отноше-

Национальная академия наук Беларуси

нию к радиочувствительной сублинии *LY-S* (Табл. 1). Анализ количества живых клеток на 1 мл суспензии через 48 ч культивирования относительно негативного и позитивного контроля показал наличие тенденции к ростостимулирующему эффекту ДГП в облученных клетках *LY-R* (Рис. 1), однако, она статистически не доказана.

Таблица 1

Влияние антимутагена дигидропиридинового ряда на уровень спонтанной и индуцированной гибели клеток в сублиниях лимфомы мыши

Вариант опыта	Линия *LY-R*		Линия *LY-S*	
	Частота мертвых клеток, %	Редукция цитотоксичности, %	Частота мертвых клеток, %	Редукция цитотоксичности, %
Негативный контроль	2,18±0,38		1,23±0,20	
ДГП 10-4М	1,48±0,13	32	0,68±0,32	45
ДГП 10-6М	1,44±0,42	34	0,34±0,08**	72
ДГП 10-9М	2,0±0,31	8	0,49±0,26	60
Позитивный контроль*	5,18±0,94*		12,42±1,78**	
ДГП 10-4М	5,04±0,77	3	6,85±0,71**	45
ДГП 10-6М	4,22±1,0	19	7,01±0,66**	44
ДГП 10-9М	4,36±0,62	16	6,11±1,08**	51

* Дозы облучения: 1 Гр для сублинии *LY-S* и 2 Гр для *LY-R*. ** Достоверные различия между негативным и позитивным контролями, а также между опытным вариантом и соответствующим контролем. Редукция цитотоксичности (5-я колонка) отражает эффективность действия антимутагена.

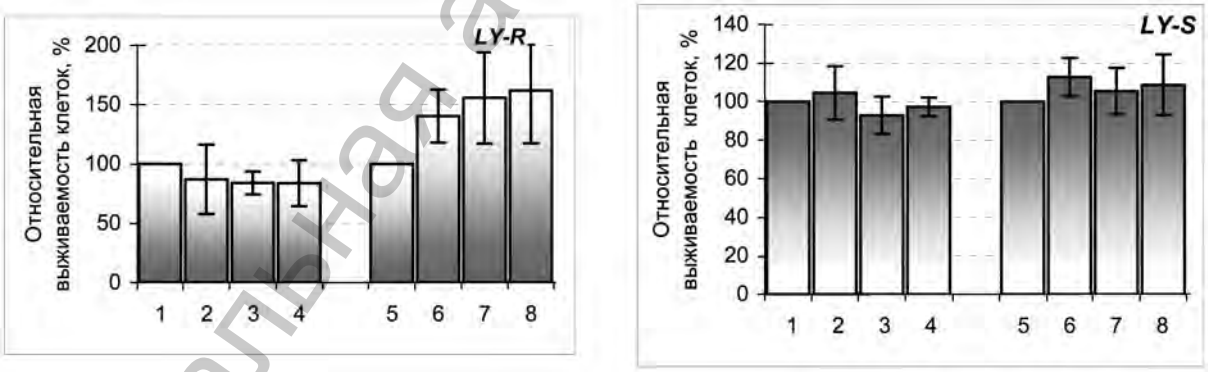


Рис. 1. Сравнение выживаемости клеток сублиний *LY-S* и *LY-R* относительно контроля 1 — негативный контроль; 5 — позитивный (радиационно-индуцированный) контроль (1 Гр для сублии *LY-S* и 2 Гр для сублинии *LY-R*); 2 (6) — ДГП 1нМ; 3 (7) — ДГП 1 мкМ; 4 (8) — ДГП 100 мкМ.

Следовательно, установлена принципиальная способность антимутагена оказывать антицитотоксическое действие, при этом, существенного влияния на рост клеток не обнаружено.

Влияние ДГП на процесс деления ядер в культуре клеток лимфомы мыши после цитохалазинового блока. Исследован антимутаген в дозах 10^{-9}, 10^{-6} и 10^{-4} М в необлученных и облученных клетках. Известно, что цитохалазин блокирует

Национальная академия наук Беларуси

цитокинез, но не останавливает репликацию ДНК и деление ядра, поэтому такие показатели как *NDI* и *BN* могут дать косвенную информацию о пролиферации клеток. Расчетные показатели представлены на рисунке (Рис. 2), из которого видно, что *NDI* в облученных клетках *LY-R* не изменялся по сравнению с контролем, но уменьшался под влиянием *X*-лучей в клетках *LY-S* (t=7,43; P=0,002). Частота двуядерных клеток снижалась в сублинии *LY-S* почти в 4 раза по сравнению с необлученными клетками и более чем в 3 раза по сравнению с облученными клетками *LY-R* (t=7,44, P=0,006 и t=5,99; P=0,009, соответственно). Сходные изменения наблюдались при фиксации материала на 24 ч культивирования клеток с той разницей, что частота бинуклеаров *LY-S* после их облучения оказалась выше (35 % по сравнению с 19 %).

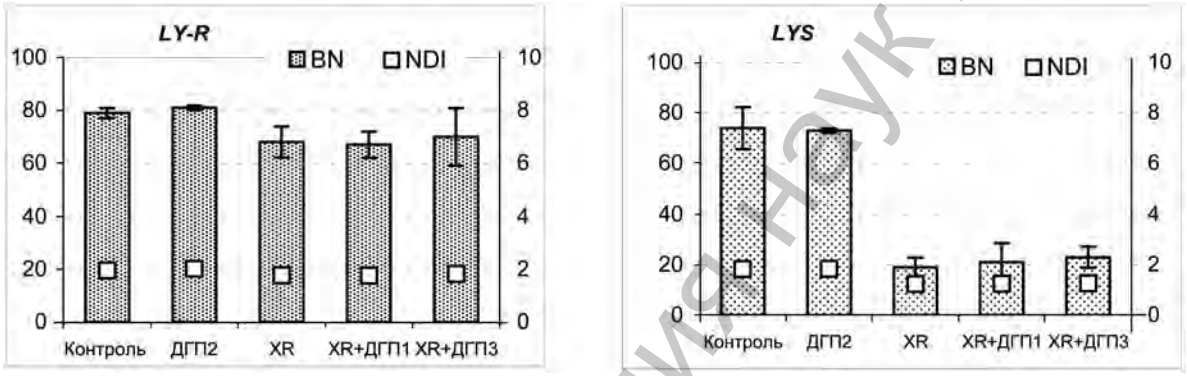


Рис. 2. Влияние ДГП на деление ядер в клетках лимфомы после цитохалазинового блока
Контроль — негативный (спонтанный), XR — контроль позитивный (1 Гр для *LY-S*; 2 Гр для *LY-R*);
ДГП1 — 100 мкМ, ДГП2 — 1 мкМ, ДГП3 — 1 нМ.

Из этого же рисунка следует, что ДГП в широком диапазоне доз не изменял исследуемые показатели относительно соответствующего контроля.

Влияние ДГП на клонообразование при культивировании клеток китайского хомячка. В этом исследовании применялись дозы рентгеновского излучения 3 — 5 Гр для клеток *CHO* и 0,3 — 0,7 Гр для *xrs6* и антимутаген при концентрациях 10^{-9}, 10^{-6} и 10^{-5}М. Результаты представлены на рисунке (Рис. 3.)

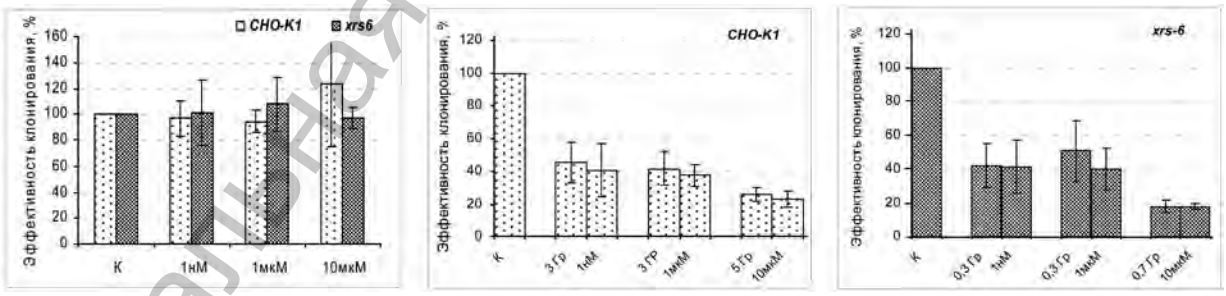


Рис. 3. Эффективность клонообразования (%) при обработке антимутагеном клеток *CHO* и *xrs6*.

За 100 % принята эффективность клонообразования необработанных клеток. Рентгеновское излучение в эквивалентных дозах, различающихся на порядок, подавляло клонообразующую активность клеток *CHO* в среднем до 45 %, а *xrs6* — до 40 %, но различия между линиями не достоверны. Антимутаген в исследованных дозах не изменял этот показатель относительно негативного и позитивного контроля. Таким образом, при данных условиях эксперимента не обнаружено влияния ДГП на пролиферацию клеток китайского хомячка.

Влияние ДГП на жизнеспособность и рост клеток лимфомы мыши в зависимости от

Национальная академия наук Беларуси

активности АТМ-киназы. Известно, что АТМ-киназа (*ataxia telangiectasia mutated*), представляет собой сигнальную молекулу, запускающую клеточный ответ на двунитевые разрывы ДНК, в том числе индуцированные радиацией, и играет важную роль в регуляции клеточного цикла [12—14]. Фармакологическая активность многих производных 1,4-ДГП обусловлена ингибированием кальциевых каналов. Однако, некоторые препараты не проявляют типичного для большинства представителей этого класса антагонизма к ионам кальция [15]; к ним относится исследованный нами препарат. Чтобы окончательно выяснить вопрос о его возможном влиянии на жизнеспособность и рост клеток, проводятся специальные эксперименты на сублинии *LY-R* с использованием ингибитора АТМ-киназы кофеина. Здесь представлены результаты, полученные в необлученных клетках (Табл. 2).

Таблица 2

Рост и гибель клеток LY-R в зависимости от действия кофеина и ДГП

№ п/п	Вариант опыта	Относительная выживаемость, %	Частота погибших клеток, %	Редукция цитотоксичности, %
1	Негативный контроль	100	3,13	
2	ДГП 1нМ	88	1,18*	62,30
3	Кофеин 2 мМ	58	3,34	
4	Кф + ДГП	56	2,26	27,80

* Редукция цитотоксичности (пятая колонка) отражает эффективность действия модификаторов. Сравнение частот погибших клеток по критерию χ^2 выявило достоверные различия в одном варианте (* при $P<0,01$).

Видно, что кофеин проявил тенденцию к подавлению роста клеток относительно негативного контроля. Антимутаген несущественно изменял рост клеток лимфомы, но на 62 % снижал спонтанную гибель клеток. Кофеин не влиял на частоту возникновения мертвых клеток, а при совместном действии уменьшал эффект ДГП. Результаты носят предварительный характер; тем не менее, подтвержден защитный (анти-цитотоксический) эффект ДГП. Модификация этого эффекта кофеином (двукратное подавление анти-цитотоксичности) может указывать на возможное использование АТМ-киназы в качестве мишени действия изученного антимутагена. Эта проблема требует дальнейшего изучения.

Заключение

Изученный антимутаген дигидропиридинового ряда в широком диапазоне доз (10^{-9}—10^{-4} М) не обладал цитотоксичностью по отношению к клеткам лимфомы мыши. Наоборот, обнаружен протекторный эффект, который выражался в подавлении спонтанной и радиационно-индуцированной гибели клеток. Действие антимутагена на рост и пролиферацию клеток исследовано с использованием различных подходов. В изученном диапазоне доз (10^{-9} — 10^{-4} М) ДГП не изменял процесс деления ядер (*NDI* и *BN*) и относительную выживаемость клеток лимфомы мыши, т.е. не оказывал какого-либо заметного влияния на рост и пролиферацию опухолевых клеток. В диапазоне доз от 10^{-9} до 10^{-5} препарат не затрагивал клонообразование при культивировании клеток китайского хомячка. Таким образом, подтверждена нейтральность изученного производного 1,4-ДГП по отношению к пролиферативной активности клеток млекопитающих. Это имеет положительное значение, т.к. открывает дополнительные свойства препарата, позволяющие использовать его не только в «здоровых», но и в опухолевых тканях. По-видимому, нет никакого противоречия между проявлением антицитотоксичности ДГП

Национальная академия наук Беларуси

и отсутствием его влияния на пролиферативную активность клеток, т.к. в основе этих эффектов могут лежать разные механизмы. Следует также предполагать, что анти-цитотоксический эффект антимутагена, скорее всего, обусловлен реализацией его антиоксидантного потенциала, тогда как влияние на уровень повреждений ДНК или цитогенетических нарушений может осуществляться другими путями.

Исследования выполнены в рамках договора о международном сотрудничестве с Отделом радиобиологии и охраны здоровья Института ядерной химии и технологии (Варшава, Польша), а также поддержаны БРФФИ (договор № Б07МС-017). Авторы выражают благодарность профессору И. Шумель за участие в организации этих исследований и ценные консультации.

Список использованных источников

1. Гончарова, Р.И. Теоретические и практические аспекты антимутагенеза / Р.И. Гончарова // Современные проблемы генетики: материалы МеждунаР. науч. конф., Минск, 17-18 ноября 2005 г. — Минск, 2005. — С. 21—25.

2. Гончарова, Р.И. Молекулярные основы применения антимутагенов в качестве антиканцерогенов / Р.И. Гончарова, Т.Д. Кужир // Экологическая генетика. — 2005. — Т. III, № 3. — С.19—31.

3. Кужир, Т.Д. Антимутагены и химический мутагенез в системах высших эукариот / Т.Д. Кужир. — Минск: Тэхналогія, 1999. — 267 с.

4. Модуляция процессов репарации ДНК на примере действия производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты / О.В. Даливеля [и др.] // Цитология и генетика. — 2005. — Т. 39, № 5. — С. 62–72.

5. A 1,4-dihydropyridine derivative reduces DNA damage and stimulates DNA repair in human cell in vitro / N.I. Ryabokon [et al.] // Mutat. Res. — 2005. — Vol. 587. — P. 52—58.

6. Szumiel, I. L5178Y sublines: a look back from 40 years. Part 1: general characteristics / I. Szumiel // Int. J. Radiat. Biol. — 2005. — Vol. 81. — P. 339—352.

7. Szumiel, I. L5178Y sublines: a look back from 40 years. Part 2: response to ionizing radiation / I. Szumiel // Int. J. Radiat. Biol. — 2005. — Vol. 81. — P. 353—365.

8. Ataxia telangiectasia: G2 checkpoint and chromosomal damage in proliferating lymphocytes / J. Pincheira [et al.] // Mutagenesis. — 2001. — Vol. 16, № 5. — P. 419—422.

9. Double strand break repair by homologous recombination is regulated by cell cycle-independent signaling via ATM in human glioma cells / S.E. Golding [et al.] // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279, № 15. — P. 15402—15410.

10. Молекулярная и прикладная генетика: науч. тР. / НАН Беларуси, Ин-т генетики и цитологии; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. — Минск, 2006. — Том 2. — 60 с.

11. Effects of an antimutagen of 1,4-dihydropyridine series on cell survival and DNA damage in *L5178Y* murine sublines / O. Dalivelya [et al.] // Nukleonika. — 2006. — Vol. 51, № 3. — P. 141—146.

12. The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage / C. Morrison [et al.] // EMBO J. — 2000. — Vol. 19, № 3. — P. 463—471.

13. Cann, K.L., Regulation of the cellular DNA double-strand break response / K.L. Cann, G.G. Hicks // Biochem. Cell Biol. — 2007. — Vol. 85, № 6. — P. 663–674.

14. Bartek, J. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression / J. Bartek, J. Bartkova, J. Lukas // Oncogene. — 2007. — Vol. 26, № 56. — P. 7773—7779.

15. Study of interaction of 1,4-dihydropyridine derivatives with glucocorticoid hormone receptors from the rat liver / A. Vaitkuviene [et al.] // Pharmacol. Rep. — 2006. — Vol. 58, № 4. — P. 551—558.

Дата поступления статьи 17 апреля 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 616.895.8 — 036.17-056.7 (476); 575.174.015.3

Е.А. Аксенова[1], Т.Н. Покладок[1], В.Г. Объедков[2], Н.Г. Даниленко[1]

ОЦЕНКА СООТНОШЕНИЙ ГЕНОТИПОВ МАТЕРИ И РЕБЕНКА ПО ГЕНАМ РЕЗУС-ФАКТОРА В СЕМЬЯХ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ

[1] ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27
[2] БГМУ МЗ РБ Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр. Дзержинского, 83

Введение

Шизофрения является тяжелым психическим заболеванием, которое приводит к инвалидности лиц молодого возраста (до 30 лет), требует дорогого медицинского обслуживания и лечения и характеризуется высоким показателем смертности пациентов из-за травматизма и самоубийств [1]. Несмотря на большое количество исследований - от цитогенетического изучения кариотипа больных до современных методов мультилокусного скрининга - генетика шизофрении до сих пор остается загадкой. К настоящему времени на 11 хромосомах человека выявлены многочисленные локусы, предположительно участвующие в той или иной степени в развитии данного заболевания [2]. Несмотря на интенсивное изучение полиморфизма генов, кодирующих биосинтез, высвобождение и метаболизм различных нейротрансмиттеров (серотонин, дофамин, норадреналин и др.) [3,4], данные о связи определенных аллельных форм генов с шизофренией часто противоречивы [5,6]. Все очевиднее становится факт отсутствия «главного гена», вызывающего шизофрению, бесспорным в настоящее время является только мультифакторная природа заболевания [7]. Спровоцировать развитие заболевания может неблагоприятное сочетание генетических, акушерско-гинекологических, социально-демографических факторов [8,9].

В ряде исследований получены достоверные данные о связи осложнений при беременности и родах с последующим развитием шизофрении [10, 11]. В связи с этими фактами одной из заслуживающих особого внимания моделей риска шизофрении является идея генетической несовместимости матери и плода. Hollister с соавторами обнаружили, что заболеваемость шизофренией была значительно выше в группе Rh-несовместимых (2,1 %) диад «мать-ребенок» по сравнению с группой Rh-совместимых (0,8 %) [12]. Предполагается, что причиной развития шизофрении может являться, в частности, несовместимость генотипов резус отрицательной матери и резус положительного плода. Была представлена теория, согласно которой резус-несовместимость (Rhesus Incompatibility) приводит к иммунологической «атаке» [13, 14], в результате которой развившиеся гипербилирубинемия и гипоксия нарушает развитие клеток нервной системы ребенка, что впоследствии увеличивает риск заболевания [15, 16]. Однако, исследование Palmer с соавторами обнаружило, что резус-несовместимость увеличивает риск по шизофрении через материнско-эмбриональные механизмы уязвимости к предродовой окружающей среде [17].

Целью настоящего исследования был анализ соотношения генотипов мать-плод по генам резус фактора в семьях, имеющих пробанда, а также в контрольных семьях. Настоящее исследование направлено на поиски мер первичной профилактики шизофрении путем идентификации надежных биологических маркеров данного заболевания. Молекулярно-генетический анализ факторов, повышающих риск развития шизофрении, проводится в Беларуси впервые.

Национальная академия наук Беларуси

Материалы и методы

В исследование включались больные с диагнозом шизофрении, установленным в соответствии с общими диагностическими критериями шизофрении Международной классификации психических и поведенческих расстройств 10 пересмотра [18]. Случайным методом была сформирована контрольная группа психически здоровых лиц (50 родительских семей, не имевших ребенка, страдавшего шизофренией). Сравниваемые группы были идентичны по всем демографическим показателям. У участвующих в исследовании лиц проводился забор 3–5 мл венозной крови с добавлением в пробирку антикоагулянта р-ра ЭДТА (50мМ на пробу). Для выделения тотальной ДНК из крови адаптирован метод Mathew [19].

Генотипирование по генам *RHD* и *RHCE* проводили методом ПЦР-анализа, с набором праймеров A6 и A9 [20] к экзону 4 изучаемых генов. Реакция проводилась в 0,2 мл ПЦР-пробирках на амплификаторах GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) или MyCycler (BIORAD). Продукты ПЦР анализировали после электрофоретического разделения в 2 % агарозном геле, окрашенном раствором бромистого этидия. Затем электрофореграмму фотографировали цифровой камерой Canon в УФ-свете. Сравнение полученных результатов проводили по методу Хи-квадрат с помощью программы AB-Stat.

Результаты и обсуждение

Генотипирование по резус-фактору проведено для детей и их матерей, как выборки больных (40 семей), так и контрольной группы (50 семей). Образец электрофоретического анализа амплифицированных фрагментов представлен на рисунке (Рис. 1).

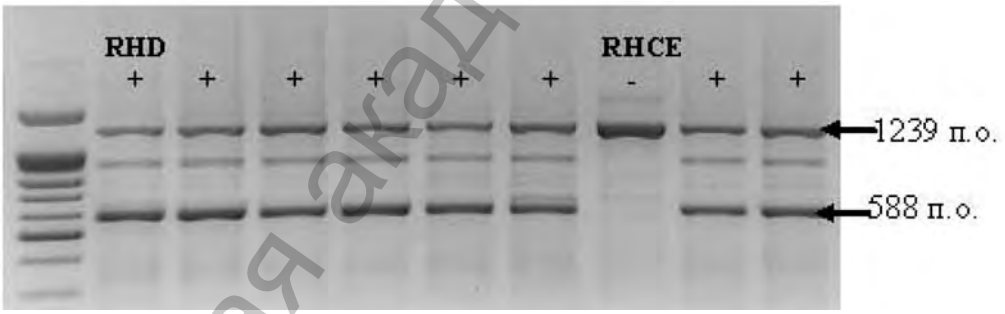


Рис. 1. Генотипирование семей с пробандом по *Rh*- гену Электрофореграмма фрагментов амплифицированного участка гена RHD, крайняя левая дорожка — маркер длин фрагментов; справа обозначены размеры фрагментов в парах нуклеотидов (2 %-ая агароза).

Проведено сопоставление частот встречаемости семей, в которых мать и ребенок имели как одинаковые, так и различные аллельные формы *Rh* гена, обуславливающего тип резус-фактора (положительный «+» генотип RHD или отрицательный «-» генотип RHCE). Согласно выдвинутой гипотезе, сочетание RHCE генотипа матери и RHD генотипа ребенка представляется наиболее критичным для плода и может послужить причиной развития заболевания. В таблице представлены результаты проведенных исследований. RHCE/RHD («-/+») сочетание в семьях с больными шизофренией встречалось в 5,8 раз чаще, чем в контрольных семьях здоровых людей (значение Хи-квадрат=7,36; различия достоверны при $P<0,01$). В целом распределение соотношения генотипов достоверно отличалось друг от друга (значение Хи-квадрат=8,6 при степени достоверности $P<0,05$).

Частота семей, в которых мать больного шизофренией имела RHCE генотип, составила 33,4 %, а в контрольной группе всего 10 % ма-

Национальная академия наук Беларуси

терей имели RHCE генотип (различия достоверны при P<0,01). При этом процент резус-отрицательных среди больных шизофренией и здоровых людей было примерно одинаковым: 20,0 % людей с RHCE-генотипом среди контролей и 23,1 % — среди больных.

Таблица

Частота встречаемости семей с различным сочетанием резус-генотипов матери и ребенка

	Соотношение генотипов по генам *Rh*-фактора мать/ребенок, (%)			
	+/-	+/+	**-/+**	-/-
Семьи с больным шизофренией	12,8	53,8	**23,1****	10,3
Контроли — здоровые семьи	14,0	76,0	**4,0 ****	6,0

** Различия достоверны при P<0,01.

Полученные результаты согласуются с гипотезой о роли резус-несовместимости генотипов матери и плода в увеличении риска развития шизофрении. Высказанная впервые в 50-е годы, с развитием методов молекулярной генетики эта гипотеза была проверена исследователями в разных странах и в целом получила подтверждение. Были получены доказательства увеличения риска развития шизофрении у детей, имеющих резус-несовместимость с генотипом матери, в популяциях Финляндии и Голландии [17, 21]. Однако доказательств возрастания риска заболевания с каждым последующим ребенком, как следствие накопления антител в крови матери, обнаружено не было [21]. Интересно, что по данным обширного исследования Hollister с соавторами (почти 2 тыс. больных), риск развития шизофрении при резус-несовместимости был показан только для мужчин [12]. Полученный нами в данной работе результат на небольшой пока выборке больных указывает на то, что выработка матерью во время беременности анти-D антител против резус-несовместимого плода, не являясь единственной причиной патологии, повышает риск его последующего заболевания шизофренией. Увеличение числа исследованных семей позволит провести более детальный анализ с учетом таких факторов, как пол пробанда, накопление антител у матери при повторных беременностях, а также оценить клинико-генетические корреляции.

Заключение

В результате проведенных исследований выявлена высокая (по сравнению с контрольной группой) частота семей с резус-несовместимостью генотипов матери и больного шизофрений ребенка. Из-за достоверно увеличенной по сравнению с контролем частоты резус отрицательных матерей в изученных семьях больных шизофренией частота резус-конфликтных сочетаний генотипов почти в 6 раз превышает таковую в контрольных семьях. В исследованной группе жителей Беларуси резус-несовместимость генотипов матери и ребенка является фактором риска развития в дальнейшем шизофрении.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (Договор №Б07-209).

Национальная академия наук Беларуси

Список использованных источников

1. Прогностическая значимость акушерско-гинекологических и наследственных факторов для развития шизофрении / М.Г. Гуменюк [и др.] // Белорусский медицинский журнал: ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал. Белорусский государственный медицинский университет. — 2005. — № 2. — С. 36—38.

2. Kniffin, C.L. OMIM №181500 SCHIZOPHRENIA / C.L. Kniffin // [Electronic resource]. Mode of access: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ — Date of access: 24.03.2008.

3. Association between a functional catechol O-methyltransferase gene polymorphism and schizophrenia: meta-analysis of case-control and family-based studies / S.J. Glatt [et al.] // Am. J. Psychiatry. — 2003. — Vol. 160, № 3. — P. 469–476.

4. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis/ N. Craddock [et al.] // J. Med. Genet. — 2005. — Vol. 42. — P. 193—204.

5. No significant association of 14 candidate genes with schizophrenia in a large European ancestry sample: implications for psychiatric genetics / A.R. Sanders [et al.] // Am. J. Psychiatry. — 2008. — Vol. 165, № 4. — P. 497—506.

6. Nasir, J. Genetic studies yield conflicting data in schizophrenia / J. Nasir // Clin. Genet. — 2001. — Vol. 60, № 5. — P.333—335.

7. Голимбет, В.Е. Генетика шизофрении / В.Е. Голимбет // Журнал неврологии и психиатрии. — 2003. — Т.103, №.3. — С.58—67.

8. Объедков, В.Г. Новые данные о природе генетического полиморфизма и их значение для теоретических моделей шизофрении / В.Г. Объедков // Белорусский медицинский журнал. — 2004. — № 1. — С. 18—23.

9. Первичный анализ акушерских, гинекологических и перинатальных факторов риска шизофрении / В.Г. Объедков [и др.] // Медицинская панорама. — 2004. — № 11. — С. 5—7.

10. Hypoxic ischaemiarelated fetal/neonatal complications and risk of schizophrenia and other nonaffective psychoses: a 19-year longitudinal study / G.L. Zornberg [et al.] // American Journal of Psychiatry. — 2000. — Vol. 157. — P. 196—202.

11. Obstetric complications and schizophrenia: prenatal underdevelopment and subsequent neurodevelopment impairment / H. Kunugi [et al.] // British Journal of Psychiatry. — 2001. — Vol.178, № 40. — P. 25—29.

12. Rhesus incompatibility as a risk factor for schizophrenia in male adults / J.M. Hollister [et al.] // Arch. Gen. Psychiatry. — 1996. — Vol.53, № 1. — P. 19—24.

13. Neurodevelopmental disorders after prenatal famine. The story of the Dutch famine study / E. Susser [et al.] // Am J Epidemiol. — 1998. — Vol. 147, №. 3. — P. 213—216.

14. Elevated Maternal Interleukin-8 Levels and Risk of Schizophrenia in Adult Offspring / A.S. Brown [et al.] // Am. J. Psychiatry. — 2004. — Vol.161. — P. 889—895.

15. Disruption of fetal brain development by maternal antibodies as an etiological factor in schizophrenia. / P. Laing [et al.] // Neural development and schizophrenia: theory and research / S.A. Mednick, J.M. Hollister (ed.) — New York. 1995. — P. 215—245.

16. Maternal-fetal blood incompatibility and the risk of schizophrenia in offspring. / B.J. Insel [et al.] // Schizophr Res. — 2005. — Vol. 80. — P. 331—342.

17. RHD maternal-fetal genotype incompatibility increases schizophrenia susceptibility/ C.G.S. Palmer [et al.] // Am. J. Hum. Genet. — 2002. — Vol. 71. — P.1312—1319.

18. Карманное руководство к МКБ-10: Классификация психических и поведенческих расстройств (с глоссарием и исследовательскими диагностическими критериями) / Под ред. Дж. Э. Купера // пеР. с англ. Д. Полтавца — К.: Сфера, 2003. — 464 с.

19. Mathew, C.C. The isolation of high molecular weight eucaryotic DNA / C.C. Mathew // Meth. Mol. Biol./ J.M. Walker (ed.). — Human Press, 1984. — Vol. 2. — P. 31—34.

20. Rapid Rh D genotyping by polymerase chain reaction-based amplification of DNA / S. Sirnsek [et al.] // Blood. — 1995. — Vol. 85, № 10. — P. 2975—2980.

21. RHD maternal–fetal genotype incompatibility and schizophrenia: extending the MFG test to include multiple siblings and birth order. / P. Kraft [et al.] // European Journal of Human Genetics. — 2004. — Vol. 12. — P. 192—198.

Дата поступления статьи 8 апреля 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 616.8-056.7-02-053.2

Т.С. Зимовина

МУТАЦИИ И ПОЛИМОРФНЫЕ АЛЛЕЛИ ГЕНА АРИЛСУЛЬФАТАЗЫ А ПРИ МЕТАХРОМАТИЧЕСКОЙ ЛЕЙКОДИСТРОФИИ

ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» МЗ РБ
Республика Беларусь, 220053, г. Минск, ул. Орловская, 66

Введение

Нейродегенеративные заболевания — серьезная и не до конца изученная проблема современной медицины. Причины этих состояний не всегда удается установить. Значительная часть прогрессирующих неврологических заболеваний имеют наследственную природу. К ним относятся и некоторые наследственные дефекты обмена веществ — лизосомные болезни [1].

Метахроматическая лейкодистрофия (МЛД) — наследственное заболевание, которое возникает вследствие дефицита лизосомного фермента арилсульфатазы А (ASA). При этом происходит активное накопление цереброзидсульфата в белом веществе головного мозга и периферической нервной системе. Сульфатиды аккумулируются также в почках, мочевом пузыре и других висцеральных органах, в существенных количествах экскретируются с мочой. На гистологических препаратах и в осадке мочи сульфатиды образуют сферические гранулы, дающие при окраске метахромазию. В норме цереброзидсульфат метаболизируется путем гидролитического отщепления 3-О-сульфата с помощью фермента ASA и термоустойчивого протеин-активатора сапозина В. При МЛД наблюдается резкое снижение или полное отсутствие ASA, что приводит к демиелинизации нейронов. В большинстве случаев больные умирают через 5—10 лет с момента появления первых симптомов болезни [2].

Клинически МЛД проявляется изменениями походки, утратой речевых навыков, интеллектуальным регрессом, тетрапарезом, периферической полинейропатией, судорожными приступами. В зависимости от возраста манифестации заболевания выделяют 3 клинические формы МЛД: позднеинфантильную (1-2 года), ювенильную (3-16 лет), взрослую (после 16 лет). Около 60 % пациентов имеют позднеинфантильную форму, 30 % ювенильную, 10 % взрослую. Заболевание имеет аутосомно-рецессивный тип наследования. Частота встречаемости МЛД 1:40000 [3].

Ген ASA человека расположен на терминальном конце длинного плеча 22 хромосомы. Состоит из 8 экзонов, кодирующих энзимную субъединицу, состоящую из 507 аминокислот [4]. Уже сегодня известно более 90 мутаций данного гена, приводящих к различным формам МЛД. Частота встречаемости и распространенность данных мутаций имеют свои популяционные особенности. Так, в европейской популяции наиболее распространены мутации 459+1G>A и P426L. У пациентов с позднеинфантильной формой МЛД чаще встречается (до 40 %) мутация 459+1G>A, которая сопровождается наиболее тяжелыми клиническими проявлениями. Результатом данной мутации является замена G→A в 609 позиции гена ASA. Переход C→T в 8 экзоне в позиции 2381 гена ASA, приводит к замене Pro426 на Leu. При этом мутантный белок обладает нормальной ферментативной активностью, но быстро разрушается из-за нарушения процесса полимеризации. Аллель P426L чаще встречается (до 42,5 %) при взрослой форме МЛД. Пациенты с ювенильной формой заболевания в большинстве являются компаундными гетерозиготными носителями двух различных мутаций [5, 6].

Снижение активности фермента ASA было обнаружено и у здоровых людей, не имеющих никаких клинических признаков МЛД. Такое состояние получило название псевдодефицита арилсульфатазы А. Две замены A→G были найдены в большинстве аллелей псевдодефицита гена ASA. Первая мутация (N350S)

Национальная академия наук Беларуси

приводит к замене аргинина на серин. Вторая (1524+95A→G), приводит к потере полиаденилатного сигнала, который используется для терминации мРНК ASA. Очевидно, что у носителей аллелей псевдодефицита остаточной активности ASA достаточно для предотвращения активного накопления цереброзидсульфата и, следовательно, процесса демиелинизации нейронов. Частота встречаемости аллелей псевдодефицита в общей популяции варьирует от 7 % до 20 % [7]. Для Беларуси этот показатель составляет 7,2 %. Индивидуумов с псевдодефицитом ASA больше, чем пациентов с настоящими формами МЛД. По этой причине существует сложность в дифференцировке между МЛД и псевдодефицитом, базируясь только на ферментативной активности, у пациентов со сниженной активностью ASA и неврологическими симптомами. Представляем вниманию читателей примеры молекулярно-генетической диагностики ювенильной формы МЛД в семье Р., включающей в себя определение носительства мутаций P426L и 459+1G>A, и диагностики псевдодефицита ASA у жителей Беларуси путем определения носительства мутаций N350S и 1524+95A→G. Данное исследование генетических дефектов гена ASA проводится в Беларуси впервые.

Материалы и методы

Объектом исследования в настоящей работе являлась геномная ДНК семьи Р. и контрольной группы, в которую вошли 103 человека, не имеющих в анамнезе каких-либо неврологических отклонений. ДНК пациентов и контрольной группы выделялась из лейкоцитов методом стандартной фенольно-хлороформной экстракции [8].

Случай из практики. Пациентка Ю. Р. — девочка с ювенильной формой МЛД. С 3—4-х лет родители стали замечать у нее нарушения походки, хромоту. Заболевание резко прогрессировало и привело к тому, что с 7-ми лет ребенок перестал ходить, говорить, различал только отца и мать, появились судорожные приступы, повторяющиеся 1 раз в 5—6 месяцев. При осмотре ребенка в 10,5 лет состояние тяжелое: самостоятельно не ходит, не сидит, отмечается атрофия мышц туловища и конечностей, выражены бульбарные расстройства (недержание мочи, затруднение глотания). МРТ головного мозга выявила признаки выраженной открытой внутренней и наружной гидроцефалии, вторичную гипогенезию мозолистого тела, тотальную церебеллярную атрофию. Осмотр ребенка в 12 лет выявил дальнейшее прогрессирование заболевания: отсутствие реакции на окружающее, тяжелейшую кахексию, децеребрационную ригидность, судорожные приступы 1 раз в 2—3 дня.

Биохимический анализ. Ферментативную активность ASA определяли в лейкоцитах пациентов и здоровых людей контрольной группы. Лейкоциты (смешанная фракция) выделяли из гепаринизированной крови с помощью дифференциального лизиса эритроцитов. Гомогенаты лейкоцитов готовили 4-х кратным замораживанием-оттаиванием в жидком азоте. Активность арилсульфатазы А определяли с паранитрокатехолсульфатом при температуре 0°С в присутствии ионов хлора и пирофосфата. Ферментативные реакции проходили непосредственно в микропланшетах в предельно малых объемах (1—20 мкл). Флуоресценцию или оптическую плотность конечного продукта измеряли на флуороскане (фильтр возбуждения 365 нм и фильтр эмиссии 460 нм) или мультискане (фильтр для измерения паранитрокатехола 520 нм) фирмы «Thermo Electrone».

Анализ мутаций P426L, 459+1G>A, N350S, 1524+95A→G. Идентификация аллелей P426L, 459+1G>A, N350S, 1524+95A→G проводилась методом полимеразной цепной реакции и методом рестрикционного анализа длины амплифицированного фрагмента с последующим разделением продуктов рестрикции в 8 % полиакриламидном геле и окрашиванием в этидиум бромиде [9]. Праймеры для ПЦР и параметры амплификации указаны в таблице (Табл.1). Для рестрикционного анализа использовались эндонуклеазы «FastDigest» (Fermentas) согласно инструкции фирмы-производителя (Табл. 2).

Национальная академия наук Беларуси

Таблица 1

Последовательность праймеров и условия для ПЦР

Мутация	Последовательность	Продукт, п.о.	Температура отжига	DMSO, 10 %	BSA
P426L	5’TCTGCCCACAGTGATACCACTCCAGAC C3’ 5’CAGGGTCCTTGGACAGGTCATAGAGCT G3’	100	55,8^{0}C	+	—
459+1G>A	5’TTTCTAGGCATCCCGTACTCCCACGTCT AG3’ 5’GGTTCTGGCAGGGGCCCTGAGGCGGGC3’	160	55,8^{0}C	+	—
N350S	5’TTG ATG GCG AAC TGA GTG AC3’ 5’CAG TGC AGG AGG CAC TGA GG3’	275	60^{0}C	+	+
1524+95A→G	5’GGT TTG TGC CTG ATA ACT TA3’ 5’TTC CTC ATT CGT ACC ACA GG3’	114	58^{0}C	+	+

Таблица 2

Рестрикционные эндонуклеазы, используемые для детекции мутаций

Аллель	Рестриктаза	Нормальный аллель, п.о.	Мутантный аллель, п.о.
P426L	PstI	100	70+30
459+1G>A	XbaI	160	130+30
N350S	BsrI	275	161+114
1524+95A→G	DdeI	114	97+17

Результаты и обсуждение

Детекция мутаций P426L, 459+1G>A. При исследовании геномной ДНК членов семьи Р. у пробанда удалось установить наличие мутантного аллеля P426L, который ассоциируется со взрослой формой МЛД и является мажорной мутацией у европейцев [10]. Мутация унаследована от отца (Рис. 1). Как показано в литературе, более чем в 50 % случаев аллель P426L сочетается с каким-либо другим мало распространенным, а, возможно, и новым мутантным аллелем. В данном случае мы можем предполагать, что мать также является носителем мутантного аллеля, идентифицировать который нам пока не удалось. Мутация 459+1G>A гена ASA не была найдена ни у одного члена семьи. Носительство мутаций N350S, 1524+95A→G, ассоциированных с псевдодефицитом ASA, у членов семьи Р. также установлено не было. Учитывая полученные результаты, клиническую картину и данные лабораторных исследований, диагноз метахроматической лейкодистрофии у пациентки Ю.Р. подтвержден. Благодаря тому, что нами идентифицирован один мутантный аллель гена ASA, семье Р. может быть предложено выявление носительства мутации P426L у последующего потомства.

Национальная академия наук Беларуси

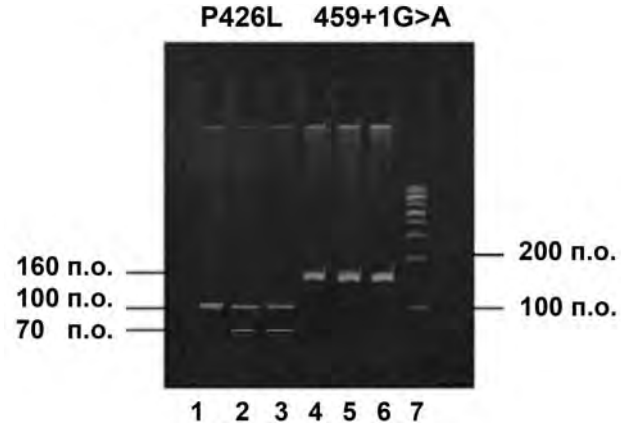


Рис. 1. Электрофоретическое разделение рестрикционных фрагментов для детектирования мутаций P426L, 459+1G>A в семье Р. Линия 1, 4 (мать) — норма по мутации P426L и 459+1G>A, линия 2, 5 (отец) — гетерозиготное носительство мутации P426L и норма по мутации 459+1G>A, линия 3, 6 (пробанд) — гетерозиготное носительство мутации P426L и норма по мутации 459+1G>A, линия 7 — маркер молекулярного веса 100 п.о.

Детекция мутаций псевдодефицита ASA. При исследовании геномной ДНК контрольной группы из 103 доноров у 15 человек были найдены мутации N350S и 1524+95A→G в различных сочетаниях (Рис. 2). Суммарное распределение генотипов мутаций псевдодефицита у жителей Беларуси представлено в таблице 3.

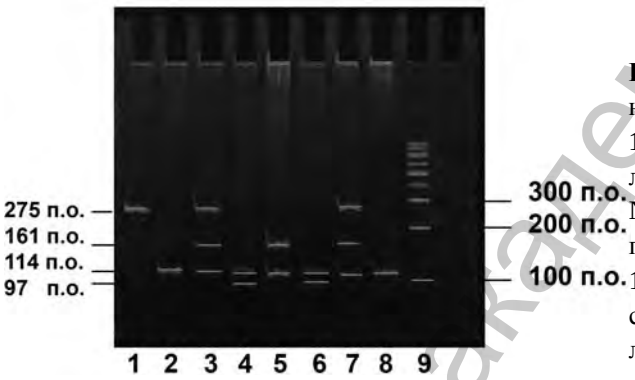


Рис. 2. Электрофоретическое разделение рестрикционных фрагментов для детектирования мутаций N350S, 1524+95A→G. Линия 1, 2 — норма по двум мутациям, линия 3, 4 — гетерозиготное носительство мутации N350S и мутации 1524+95A→G, линия 5, 6 — гомозиготное носительство мутации N350S и гетерозиготное 1524+95A→G, линия 7, 8 — гетерозиготное носительство мутации N350S и норма по мутации 1524+95A→G, линия 9 — маркер молекулярного веса 100 п.о.

Таблица 3

Генотипы мутаций псевдодефицита у жителей Беларуси

Генотип N350S	Генотип 1524+95A→G	Кол-во человек
+/+	+/-	1
+/-	+/-	11
+/-	-/-	3
-/-	-/-	88

-/- характеризует гомозиготы по нормальному аллелю
+/- характеризует гетерозиготы
+/+ характеризует гомозиготы по мутантному аллелю

У одного индивидуума было выявлено гомозиготное носительство мутации N350S и гетерозиготное носительство мутации 1524+95A→G (Рис. 2, линия 5, 6). Данный генотип ранее не описан ни в одном источнике и представляет интерес в плане изучения биохимических показателей. Мутация N350S изолированно в гомозиготном состоянии нами не обнаружена ни у

Национальная академия наук Беларуси

одного человека контрольной группы. Также не найдена изолированно мутация 1524+95A→G, как и описано в литературе. Наиболее распространенным явилось носительство двух мутантных аллелей N350S и 1524+95A→G в гетерозиготном состоянии, что соответствует аналогичным исследованиям зарубежных авторов.

Популяционная частота аллелей псевдодефицита у здоровых жителей Беларуси составляет 7,8 % для аллеля N350S (16 из 206 аллелей) и 5,8 % для аллеля 1524+95A→G (12 из 206 аллелей). Распространенность аллелей псевдодефицита в Беларуси ниже, чем, например, в Англии, где этот показатель составил 17,5 % для аллеля N350S и 13 % для аллеля 1524+95A→G [7].

Взаимосвязь мутации псевдодефицита и ферментативной активности ASA. В лейкоцитах здоровых людей с комбинацией аллелей псевдодефицита была определена активность ASA. У всех носителей мутантных аллелей, независимо от генотипа, отмечалось снижение активности фермента (Рис. 3.). Однако, самая низкая активность ASA была выявлена у гетерозиготных носителей двух мутантных аллелей. Как и описано в литературе, такой генотип, действительно, является наиболее «ущербным» и приводит к более резкому снижению ферментативной активности ASA. Так, средний показатель активности ASA у индивидуумов с генотипом N350S/N, 1524+95A→G/N составил 4,5 нмоль/ч/мг белка, для индивидуумов с генотипом N350S/N, N/N 7,1 нмоль/ч/мг белка. Учитывая то, что в нашем исследовании был найден всего один человек с генотипом N350S/N350S, 1524+95A→G/N, провести сравнительный анализ ферментативной активности при таком генотипе у разных индивидуумов не представляется возможным. Из полученных данных видно, что ни у одного человека, у которого были детектированы мутации N350S, 1524+95A→G, 1524+95A→G, независимо от генотипа, нормальных значений (9-22 нмоль/ч/мг белка) активности лизосомного фермента ASA выявлено не было. Это еще раз подтверждает, что, опираясь только на биохимическое исследование ASA, невозможно провести дифференциальную диагностику между псевдодефицитом и различными формами МЛД.

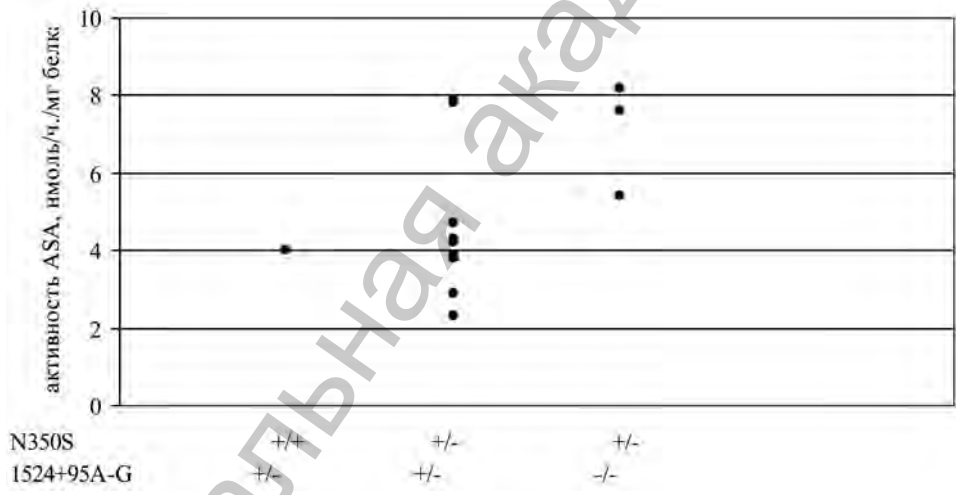


Рис. 3. Взаимосвязь активности ASA и генотип.

Заключение

Метахроматическая лейкодистрофия, как и большинство наследственных дефектов обмена веществ, не имеет специфических клинических проявлений. Учитывая тот факт, что это заболевание непосредственно затрагивает нервную систему, прогноз для пациентов неблагоприятный. Лабораторная диагностика МЛД базируется на выявлении основного био-

Национальная академия наук Беларуси

химического и генетического дефектов. Важной диагностической проблемой МЛД является существование аллелей псевдодефицита, которые представляют полиморфизмы генов, приводящие к снижению активности ASA. Наше исследование наглядно показывает достаточно высокую частоту встречаемости этих аллелей среди здоровых людей — 7,2 % в Беларуси. По этой причине очень сложно дифференцировать МЛД от носительства аллелей псевдодефицита у пациентов со сниженной активностью ASA и неврологической симптоматикой, опираясь только на ферментативную активность ASA.

Серьезной проблемой остается пренатальная диагностика МЛД в семьях, в которых родители являются носителями аллелей МЛД и аллелей псевдодефицита [11]. В случае сниженной активности ASA у плода различить МЛД и псевдодефицит невозможно, используя только биохимические методы диагностики. Возможность детектировать мутации, приводящие к псеводефициту, и мутации различных форм метахроматической лейкодистрофии, позволит врачам дифференцировать данные состояния и поставить правильный диагноз.

Список использованных источников

1. Гусина, Н.Б. Лизосомные лейкодистрофии как причина наследственных нейродегенеративных заболеваний детского возраста / Н.Б. Гусина [и др.] // Медицинские новости. — 2008. — № 1. — С. 102—105.

2. Gustavson, K.H. The incidence and genetics of metachromatic leucodystrophy in northern Sweden / K.H. Gustavson [et al.] // Asta Pediart Scand. — 1971. — Vol. 60. — P. 585—590.

3. Heinisch, U. Multiple mutations are responsible for the high frequency of metachromatic leucodystrophy in a small geographic area / U. Heinisch [et al.] // Am. J. Hum. Genet. — 1995. — Vol. 56. — P. 51—57.

4. Kreysing, H.J. Structure of the human arylsulfatase A gene / H.J. Kreysing [et al.] // Eur. J. Biochem. — 1990. — Vol. 191. — P. 627—631.

5. Polten, A. Molecular basis for the different forms of metachromatic leucodystrophy / A. Polten [et al.] // Engl. J. Med. — 1991. — Vol. 324. — P. 18—22

6. Barth, M.L. Prevalence of common mutations in metachromatic leucodystrophy patients in Britain / M.L. Barth [et al.] // Hum. Genet. — 1993. — Vol. 91. — P. 73—77.

7. Nelson, P.V. Population frequency of the arylsulfatase A pseudodeficiency allele / P.V. Nelson [et al.] // Hum. Genet. — 1991. — Vol. 87. — P. 87—88.

8. Barth, M.L. The arylsulfatase A gene and molecular genetics of metachromatic leucodystrophy / M.L. Barth [et al.] // J. Med. Genet. — 1994. — Vol. 31. — P. 667—671.

9. Miller, S.A. A simple salting out method for extracting DNA form nucleated cells / S.A. Miller [et al.] // Nucleic Asids Res. — 1988. — Vol. 16. — P. 1215.

10. Berger, J. Simultaneous detection of the two most frequent metachromatic leucodystrophy mutations / J Berger [et al.] // Hum. Genet. — 1993. — Vol. 92. — P. 421—423.

11. Berna, L. Novel mutations associated with metachromatic leucodystrophy: phenotype and expression studies in nine Czech and Slovak patients / L. Berna [et al.] // Am. J. Hum. Genet. — 2004. — Vol. 129. — P. 277—281.

Дата поступления статьи 17 марта 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 616.981.48 — 02:577.21 (476)

Т.В. Демидович

ПОЛИМОРФИЗМ ПРОМОТОРА ГЕНА УДФГТ1А1 У БЕЛОРУССКИХ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ЖИЛЬБЕРА

ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» МЗ РБ
Республика Беларусь, 220053, г. Минск, ул. Орловская, 66

Введение

Синдром Жильбера — наследственное заболевание печени дистрофического характера, основным проявлением которого является неконъюгированная гипербилирубинемия. В основе этого заболевания лежит нарушение экспрессии фермента уридилдифосфоглюкуронозилтрансферазы (УДФГТ1А1), участвующей в процессе образования моно- и диглюкуронидов билирубина [1].

По различным данным, синдром Жильбера встречается с частотой от 5 % до 10 % в странах центральной Европы, выявляется, преимущественно, в детском или юношеском возрасте и характеризуется умеренным повышением уровня неконъюгированного билирубина [2].

Для данного заболевания характерна триада клинических проявлений: интермиттирующая желтуха с изолированным или преимущественным повышением неконъюгированного билирубина, астеноневротические симптомы, а также абдоминальные боли и диспепсические нарушения. Наличие двух последних признаков необязательно. В некоторых случаях желтуха обнаруживается случайно при обследовании по различным поводам у лиц, считающих себя здоровыми. При биохимическом исследовании крови в первую очередь обращает на себя внимание повышение общего билирубина за счет непрямой фракции; остальные печеночные пробы, как правило, не изменены. Показано, что повышение уровня билирубина при синдроме Жильбера провоцируется значительными физическими и психоэмоциональными нагрузками, пищевыми погрешностями, голоданием, приемом некоторых медикаментов, инфекционными заболеваниями (вирусный гепатит, грипп, ОРВИ, кишечные инфекции и др.) [3].

В литературе обсуждается как аутосомно-рецессивный [4], так и аутосомно-доминантный [5] тип наследования синдрома Жильбера. В последние годы было установлено, что среди европейцев синдром Жильбера в большинстве случаев обусловлен мутацией не в кодирующей последовательности, а в промоторе гена УДФГТ1А1. У пациентов с синдромом Жильбера обнаружена инсерция двух нуклеотидов ТА в области промотора (мутация UGT1A1*28) с образованием семи повторов вместо шести. [2, 4].

При наличии двух дополнительных нуклеотидов ТА транскрипция гена снижается до 30 % от нормального уровня, что приводит к снижению конъюгации билирубина в гепатоцитах у гомозиготных носителей. Частота мутантного аллеля УДФГТ1А1*28 среди европейцев оценивается в пределах 35-40 % [2]. Кроме того, последние исследования показали, что в редких случаях данное заболевание у европейских пациентов может быть обусловлено носительством двух дополнительных ТА-повторов — $(TA)_8$ [6]. Основываясь на том факте, что количество гомозиготных носителей мутации УДФГТ1А1*28 превышает количество пациентов с неконъюгированной билирубинемией, некоторые исследователи предполагают наличие дополнительных факторов, необходимых для развития характерной клинической картины. В качестве данных факторов предлагается рассматривать снижение продолжительности циркуляции в крови эритроцитов, а также нарушение процессов захвата билирубина гепатоцитами [2].

Ввиду доброкачественного характера гипербилирубинемии синдром Жильбера не требует лечения. Трудности возникают в тех случаях,

Национальная академия наук Беларуси

когда эта патология не распознается и ошибочно диагностируются другие заболевания [7]. Помимо билирубина, УДФГТ1А1 в печени нейтрализует огромное количество ксенобиотиков путем их окислительной этерификации, при дефиците УДФГТ1А1 снижается защита не только от билирубина, но и от многих других гидрофобных токсичных соединений. В литературе приводятся сведения о развитии острых токсических реакций на некоторые лекарственные препараты, что ограничивает применение этих лекарств у больных синдромом Жильбера [7].

Вопрос о диагностике синдрома Жильбера до последнего времени оставался нерешенным. Несмотря на достаточное количество функциональных тестов, диагноз, как правило, ставился методом исключения.

Раскрытие молекулярно-генетической природы заболевания позволило значительно повысить эффективность диагностики путем внедрения в практику высокочувствительных методов ПЦР. В большинстве случаев, дифференциальная диагностика для синдрома Жильбера проводится в первую очередь с синдромом Криглера-Найяра тип II, который вообще исключительно сложно дифференцировать от синдрома Жильбера без использования молекулярно-генетической диагностики, а также со всеми наследственными и ненаследственными заболеваниями, сопровождающимися желтухой. Ввиду клинической доброкачественности синдрома достоверность диагноза имеет значение для отмены активной терапии по поводу вирусного гепатита в отсутствие соответствующих лабораторных маркеров. В настоящее время в странах Европы выявление дефекта УГТ1А1 проводится также перед назначением ряда лекарственных препаратов, таких как озаланин, иринотекан и т.д., с целью прогнозирования возможных осложнений [9].

Материалы и методы

Объектом исследования в настоящей работе являлась геномная ДНК 363 больных с желтухой неясного генеза: 66 женщин и 303 мужчины в возрасте от 3 месяцев до 51 года из неродственных семей. ДНК пациентов и контрольной группы выделялась из лейкоцитов методом стандартной фенольно-хлороформной экстракции. Для определения частоты мутантных аллелей в белорусской популяции использовалась геномная ДНК от 100 доноров.

Определение количества ТА-повторов в промоторе гена УДФГТ1А1

Амплифицировали участок геномной ДНК, содержащий ТАТАА-блок промотора гена UGT1A1. Условия амплификации: в общем объеме амплификационной смеси, равном 20 мкл, содержались 1 мкл (50-500 нг) геномной ДНК, 0,2 мМоль дезоксинуклеотидтрифосфатов, 2,5 мМоль $MgCl_2$, по 1 пМоль каждого праймера, 0,2 ед Taq полимеразы. Используемые праймеры:

Gil-R	5’ GTC ACG TGA CAC AGT CAA AC 3’
Gil-F	(FAM)5’ TTT GCT CCT GCC AGA GGT T 3’

Амплификационная программа: 95 °С в течение 5 мин, 30 циклов со следующими параметрами: денатурация при температуре 95°С в течение 30 с, отжиг праймеров при температуре 58°С в течение 40 с, элонгация при 72°С в течение 40 с Конечная элонгация при 72°С продолжалась 5 мин.

Оценка количества ТА-повторов в промоторе гена UGT1A1 осуществлялась методом капиллярного гель-электрофореза на генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Рис.1).

Национальная академия наук Беларуси

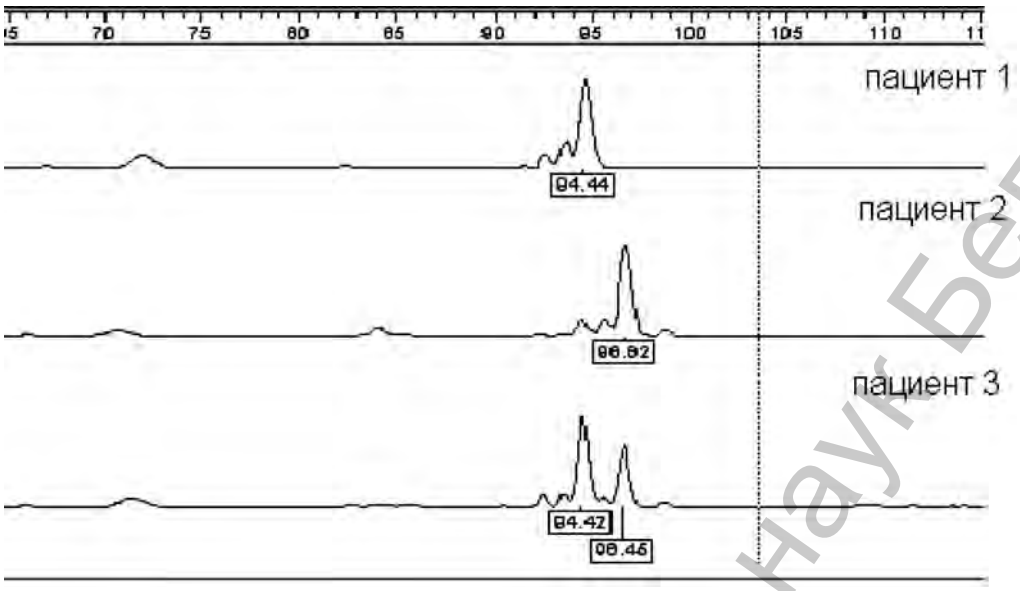


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации для детектирования количества (ТА) - повторов в промоторе гена УДФГТ1А1.

Пациент 1 является гомозиготным носителем нормального варианта промотора гена УДФГТ1А1 (амплифицированный участок составляет 94 п.о.).
Пациент 2 — гомозиготный носитель мутации УДФГТ1А1*28 (амплифицированный участок составляет 96 п.о.).
Пациент 3 является гетерозиготным носителем мутантного аллеля УДФГТ1А1*28 (при электрофорезе выявляется два пика — 94 п.о. и 96 п.о.)

Ампликон длиной 96 п.о. соответствовал участку промотора гена УДФГТ1А1 с 7 (ТА)-повторами, что позволило подтвердить диагноз «синдром Жильбера». Ампликон длиной 94 п.о. соответствовал нормальному участку промотора гена УДФГТ1А1 с 6 (ТА)-повторами. Наличие обоих ампликонов длиной 96 п.о. и 94 п.о. свидетельствовало о гетерозиготном носительстве 6/7 (ТА)-повторов.

Результаты и обсуждение

По результатам молекулярно-генетических исследований у 311 из 363 пациентов было выявлено гомозиготное носительство (ТА)7-повторов, 37 пациентов оказались гетерозиготными носителями (ТА)6/7, у 14 пациентов было обнаружено нормальное количество повторов — (ТА)6/6 (Табл.1). У одного пациента обнаружена вставка двух ТА-повторов — (ТА)7/8.

Таблица 1

Распределение генотипов у пациентов с неконъюгированной гипербилирубинемией

Генотип	Количество пациентов	Процентное соотношение
ТА (6/6)	14	3,8 %
ТА (6/7)	37	10 %
ТА (7/7)	311	86 %
ТА (7/8)	1	0,2 %

Национальная академия наук Беларуси

Результаты исследований позволяют говорить о том, что у большинства белорусских пациентов с неконъюгированной желтухой генетические повреждения локализованы на промоторном участке гена УДФГТ1А1. Вставка дополнительной пары нуклеотидов ТА, характеризующаяся наличием семи двойных повторов, согласно литературным источникам, нарушает связывание факторов транскрипции, что приводит к снижению синтеза фермента. Согласно данным о существовании обратной зависимости между длиной промоторного участка и экспрессией гена УДФГТ1А1, наличие у больного (ТА)7/8 варианта является подтверждением диагноза «синдром Жильбера». У пациентов с генотипами (ТА)6/7 и (ТА)6 неконьюгированная билирубинемия, вероятно, могла быть вызвана гетерозиготным носительством мутаций в кодирующей области гена УДФГТ1А1 либо была проявлением какого-либо другого заболевания инфекционной или неинфекционной этиологии.

При обследовании контрольной группы были выявлены следующие варианты промотора гена УДФГТ1А1: (ТА)6/6, (ТА)6/7 и (ТА)7/7 (Табл.2).

Таблица 2

Распределение генотипов в контрольной группе

Генотип	Количество обследованных	Процентное соотношение
ТА (6/6)	40	40 %
ТА (6/7)	44	44 %
ТА (7/7)	16	16 %

Согласно полученным результатам, мутация промотора гена УДФГТ1А1 встречается с достаточно высокой частотой в белорусской популяции, что позволяет предположить существование скрытых, бессимптомных форм синдрома Жильбера. В целом, данные, полученные в настоящем исследовании, согласуются с результатами аналогичных исследований зарубежных авторов, в частности, частота гомозиготного носительства (ТА)7 в европейских популяциях оценивается в пределах 11-16 % [2].

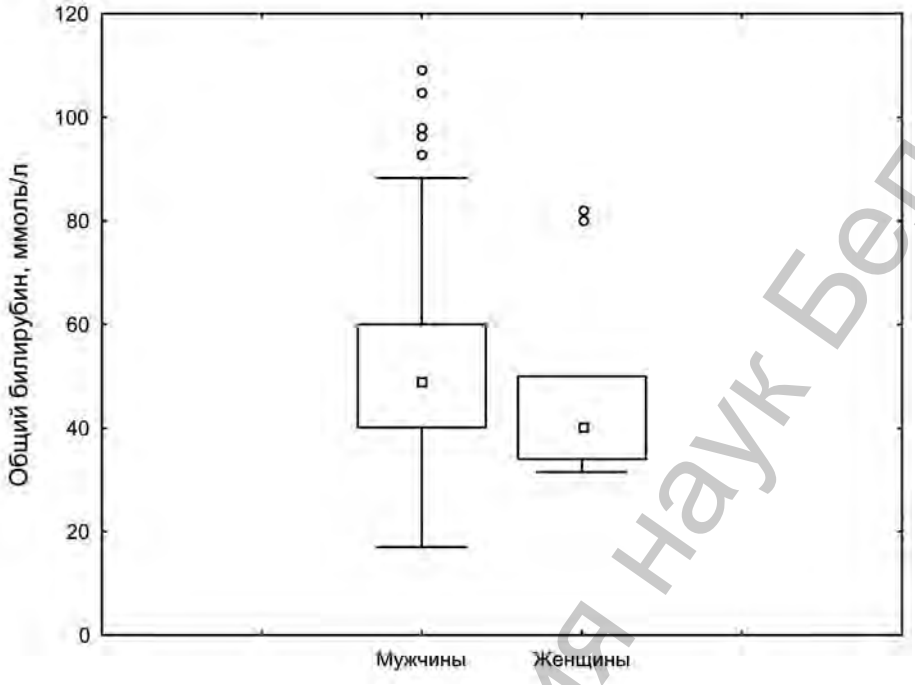
Клиническая и клинико-лабораторная картина синдрома Жильбера, обусловленного мутациями в промоторе гена УДФГТ1А1.

Случай из практики. Пациент В., 20 лет. При профосмотре в 18 лет выявлено повышение общего билирубина до 33 ммоль/л. повторное обследование показало повышение уровня общего билирубина до 49 ммоль/л преимущественно за счет фракции непрямого билирубина (43 ммоль/л). Маркеры вирусных гепатитов — отрицательные, уровень аминотрансфераз — в пределах нормы. При осмотре обращает на себя внимание легкая иктеричность склер и кожи грудной клетки. При ультразвуковом исследовании органов брюшной полости обнаружены умеренные диффузные изменения в печени. У пациента жалоб нет.

Молекулярно-генетическое исследование количества ТА-повторов в промоторе гена УДФГТ1А1 у данного пациента выявило гомозиготное носительство дополнительных двух нуклеотидов. Генотип (ТА) 7/7.

Биохимические показатели. Исследование биохимических параметров пациентов с генотипом (ТА)7/7 показало характерное повышение концентрации общего билирубина в крови в среднем до 46,68 ± 17,17 (стандартное отклонение) ммоль/л преимущественно за счет фракции неконъюгированного билирубина; у отдельных пациентов наблюдался подъем до 100 ммоль/л и выше (Рис. 2). Показатели общего билирубина различались у мужчин и женщин, но в обеих группах были значительно выше нормальных значений. Уровень АСТ, АЛТ и щелочной фосфатазы у пациентов находились в пределах нормальных значений.

Национальная академия наук Беларуси



□ Медиана
⌐ 25 %-75 % перцентили
⊤ Значения, не выпадающие из общей тенденции
○ Значения, выпадающие из общей тенденции
* Экстримы

Рис. 2. Уровень общего билирубина в сыворотке крови у больных синдромом Жильбера.

Клиническая картина. В целом, в клинической картине преобладали следующие симптомы: слабость, утомляемость, нервозность, иктеричность кожи, слизистых и склер. У 20 % больных жалобы отсутствовали. Таким образом, клиническая картина при синдроме Жильбера, обусловленном изменениями в промоторе гена УДФГТ1А1, является неспецифичной и может наблюдаться при более тяжелых, в некоторых случаях потенциально летальных заболеваниях печени на начальных стадиях.

У большинства пациентов впервые повышение общего билирубина было выявлено в возрасте от 10 до 20 лет, в этом возрасте риск развития неконъюгированной билирубинемии у гомозиготных носителей мутации UGT1A1*28 наиболее высок. В целом, возраст начала клинических проявлений у гомозиготных носителей мутации UGT1A1*28, а именно появление желтухи, в настоящем исследовании варьировал в широких пределах — от нескольких месяцев до 30-40 лет, из чего следует, что данное заболевание может манифестировать, практически, в любом возрасте и гомозиготным носителям мутантного аллеля (ТА)7/7 целесообразно проводить профилактику синдрома Жильбера в течение всей жизни. Под профилактикой в данном случае понимается исключение указанных выше факторов внешней среды, способных провоцировать повышение непрямого билирубина.

Среди пациентов с подтвержденным диагнозом синдром Жильбера преобладали мужчины (5:1), что соответствует результатам исследований других авторов [5]. В настоящее время не существует четкого объяснения такому половому распределению пациентов. Данный факт может быть объяснен тем, что большинство обследуемых пациентов являлись мужчинами в возрасте 15—20 лет, проходившими, вероятно, медицинский осмотр на пригодность к выполнению воинской обязанности, в результате которого им и было установлен предварительный диагноз «синдром Жильбера» в связи с повышением уровня общего билирубина. С другой стороны, повышенная физическая нагрузка у мужчин может также быть

Национальная академия наук Беларуси

причиной повышенного распада гемоглобина, а, следовательно, и увеличения уровня неконъюгированного билирубина при недостаточной активности УДФ-глюкуронозилтрансферазы.

Заключение

В белорусской популяции у пациентов с синдромом Жильбера основным генетическим дефектом является ТА-инсерция в промоторе гена УДФГТ1А1, выявленная у 86 % больных. Согласно популяционным исследованиям, данная мутация встречается у 16 % населения, что говорит о достаточно высокой частоте заболевания среди жителей Беларуси. Клинический диагноз синдрома Жильбера в большинстве случаев основан на наличии у пациента умеренной неконъюгированной гипербилирубинемии при отсутствии гемолиза и нормальном уровне аминотрансфераз и щелочной фосфатазы. В некоторых исследованиях верификация диагноза проводится на основании резкого повышения уровня неконъюгированного билирубина после ограничительной 24-часовой диеты [8]. Очевидно, что такие методы диагностики синдрома Жильбера вследствие крайне неспецифичной клинической и клинико-лабораторной картины являются недостаточно эффективными для проведения дифференциальной диагностики с другими заболеваниями. В целом, исходя из полученных результатов, можно заключить, что оценка изменений в промоторе гена, основанная на определении количества (ТА)-повторов в промоторе гена UGT1A, является на данный момент единственным достоверным методом диагностики данного заболевания.

Список использованных источников

1. Chowdhury, J.R. // The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. NY.1995. Vol.1. P. 2161—2208.

2. Bosma P.J., Chowdhury J.R., Bakker C. // The N.Engl.J.Med.1995. Vol. 333(18). P. 1171—1175.

3. Sampietro, M., Iolascon A. // Haematologica. 1999. Vol. 84. P. 150–157.

4. Owens, I.S. // Pharmacogenetics. 1992. Vol. 2. P. 92—108.

5. Akaba, K. // Biochem.Molec.Biol.Int. 1998. Vol.46. P. 21—26.

6. Biondi, M.L. Turri O., Dilillo D..//Clin. Chem.1999. Vol. 45(6). P. 897—898.

7. Мамаев, С.Н. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.2005. Том 15. №3. С.28—34.

8. Borlak, J., Thum T.,Landt.// Hepatology.2000. Vol.32. №4. P. 792-795.

9. Monaghan. G., Ryan M., Seddon R .// The Lancet. 1996. Vol. 347. P. 578—581.

Дата поступления статьи 17 марта 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 575.174.015.3:616:572.941.5

О.Д. Левданский, Н.Г. Даниленко, О.Г. Давыденко

ЧАСТОТЫ ПОЛИМОРФНЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ АЛЬФА (TNFα) У БЕЛОРУСОВ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Фактор некроза опухолей альфа занимает ключевую позицию в развитии воспалительной реакции, независимо от этиологической причины. Он принимает участие в воспалении как прямым, так и косвенным способом: в первом случае, стимулируя хемотаксис нейтрофилов в очаг воспаления, во втором — индуцируя синтез других провоспалительных медиаторов. *TNFα* стимулирует экспрессию молекул адгезии на поверхности эндотелиальных клеток и нейтрофилов, увеличивая таким образом тропность данных клеток друг к другу. Кроме того, *TNFα* стимулирует миграцию нейтрофилов через сосудистую стенку в очаг повреждения. В очаге воспаления *TNFα* играет значительную роль в разрушении патологических агентов: стимулируя фагоцитоз и индуцируя «оксидативный стресс». «Кислородный взрыв» происходит путем стимуляции образования в нейтрофилах активных форм кислорода, окиси азота и гипохлорной кислоты [1].

Помимо участия в остром воспалении, *TNFα* играет роль в хронизации воспалительного процесса как за счет повышения адгезии макрофагов, которые, как известно, являются основными клетками-эффекторами хронического воспаления, так и опосредованно, индуцируя синтез *NO*. Под влиянием *TNFα* резко увеличивается образование макрофагами и нейтрофилами перекиси водорода и других свободных радикалов. При хроническом воспалении *TNFα* активирует катаболические процессы и тем самым способствует развитию кахексии — симптома многих хронических заболеваний [2].

Цитотоксическое действие *TNFα* на опухолевую клетку связано с деградацией ДНК и нарушением функционирования митохондрий. Литический эффект *TNFα* усиливается в присутствии интерферона. Один из механизмов синергического действия двух этих цитокинов состоит в усилении экспрессии рецепторов к *TNFα* на опухолевых клетках под влиянием интерферонов [1].

В последние годы исследования многих лабораторий мира направлены на изучение роли полиморфных аллелей гена *TNFα* в этиологии аутоиммунных, инфекционных, сердечно-сосудистых и других заболеваний. В связи с этим целью настоящего исследования было определить частоты встречаемости аллельных вариантов полиморфизма-308G/A в районе промотора гена *TNFα* в контрольной выборке белорусов.

Материалы и методы

В исследовании участвовали 100 фенотипически здоровых добровольцев, коренных жителей Беларуси.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови добровольцев проводили по методу Mathew (1984) [3] с использованием неионогенного детергента тритона *X*-100 для лизиса эритроцитов, после чего лейкоциты лизировали додецилсульфатом натрия. Депротеинизацию ДНК осуществляли с помощью протеиназы *K*, с последующей переочисткой фенол-хлороформом.

Идентификацию полиморфных аллелей гена *TNFα* проводили методом ПЦР-ПДРФ анализа: после амплификации со специфическими праймерами по стандартному про-

Национальная академия наук Беларуси

токолу ПЦР-фрагмент обрабатывали эндонуклеазой *NcoI*, согласно рекомендациям фирмы-производителя Fermentas (Литва). Визуализацию рестрикционных фрагментов проводили методом электрофореза в 8 % неденатурирующем полиакриламидном геле в 1×TBE буфере, окрашивали в растворе этидиум бромида, затем полученную электрофореграмму фотографировали цифровой камерой Nikon 2100 в УФ-свете.

Результаты и обсуждение

Ген *TNFα* картирован на хромосоме 6p21.3 и имеет размер 2762 п.о. К настоящему времени описано более 30 полиморфных вариантов этого гена, однако наиболее активно изучается полиморфизм-308 *G/A*, локализованный в районе промотора гена *TNFα*. Наличие гуанина (*G*) в позиции-308 определяет аллель *TNFα1*, являющийся широко распространенным. Присутствие в этой точке аденина (*A*) — более редкий аллельный вариант *TNFα2* [4].

Показано, что мутация-308 *G/A* (аллель *TNFα2*) сопровождается повышением выработки фактора некроза опухолей почти в 2 раза, что обусловлено усилением транскрипции данного гена [5]. Мутантный аллель *TNFα2* оказывает модулирующее действие при развитии ряда патологий. В различных европейских популяциях его частота варьирует, по данным разных авторов, от 8 % до 27 % [6].

На рисунке (Рис.1) представлен результат ПЦР-ПДРФ анализа, используемого для идентификации аллельного полиморфизма гена *TNFα*.

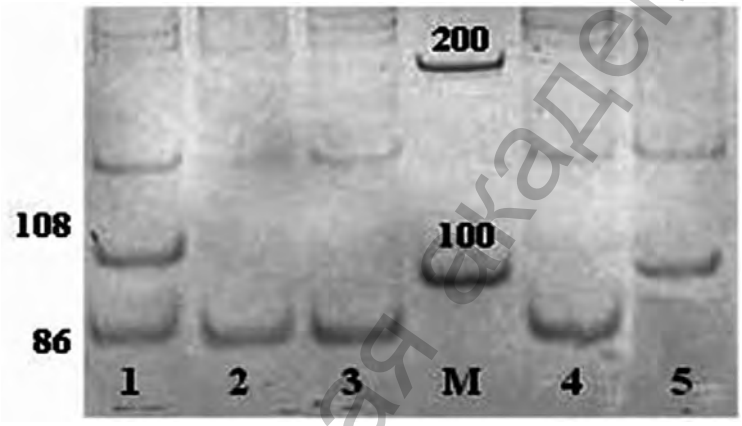


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции амлифицированного фрагмента локуса *TNFα*.

Дорожки 2,3,4 — гомозиготные генотипы *TNFα1/TNFα1;* дорожка 1 — гетерозиготный генотип *TNFα1/TNFα2;* дорожка 5 — гомозиготный генотип *TNFα2/TNFα2;* M — маркер длин 100bp+1,5.ц Цифрами указаны размеры фрагментов ДНК.

По результатам данного исследования частота встречаемости *TNFα2* в проанализированной выборке белорусов составила 15 %, что несколько превышает таковую у населения России — 11 % (Томск) [7].

Наблюдаемая частота аллеля *TNFα1* среди населения Беларуси составила 85 %, что является средним показателем для изученных европейских популяций, который, по данным разных авторов, варьирует от 73 % до 92 % [6].

Наибольшую распространенность у представителей разных этносов имеет генотип *TNFα1/TNFα1*. У белорусов его частота достигает 71 %; на гетерозиготных носителей мутации приходятся 28 % (Табл. 1).

Следует отметить, что в проанализированной выборке в 100 человек, только один был определен как гомозиготный носитель самого редкого генотипа *TNFα2/TNFα2*; таким образом, его частота составила 1 % (Табл. 1). Распределение генотипов соответствует закону Харди-Вайндберга (χI=0,01, P=0,99).

Национальная академия наук Беларуси

Таблица 1

Частоты генотипов по локусу *TNFα* (-308G/A) в исследованной популяции белорусов

Генотип	Нуклеотидная замена	Частота, %
TNFα1/TNFα1	*G/G*	71
TNFα1/TNFα2	*G/A*	28
TNFα2/TNFα2	*A/A*	1

Опубликован ряд работ, где показана взаимосвязь полиморфизма-308 *G/A* с рядом патологических состояний. Так, в группе больных с атопическим дерматитом выявлена ассоциация аллеля *TNFα1* с тяжестью проявления заболевания, что выражается частыми обострениями, наличием обширных очагов поражения, увеличением всех групп лимфатических узлов, в то время как носительство мутантного аллеля *TNFα2* играет протективную роль в развитии атопического дерматита [8].

Кроме того, для фактора некроза опухолей доказано участие в формировании сердечно-сосудистой патологии, так как этот белок играет важную роль в процессах декомпенсации, развитии недостаточности и апоптоза кардиомиоцитов. Для аллеля *TNFα2* выявлено протективное действие в развитии гипертрофической кардиомиопатии [9].

В исследовании Casano-Sancho с соавт. (2006) продемонстрирована взаимосвязь генотипа *TNFα1/TNFα1* с повышенным риском неразвивающейся беременности [10]. Подобные результаты опубликованы и в работе Назаренко с соавт. (2006), где также показана ассоциация полиморфизма-308 *G/A* с жизнеспособностью эмбрионов человека. Установлены статистически значимые различия в частотах генотипов и аллелей гена *TNFα* между группами новорожденных и спонтанных абортусов при неразвивающихся беременностях [11]. Кроме того, установлены ассоциации гена *TNFα* с преэклампсией [12], а также с осложнением гестозов у женщин [13].

К настоящему времени имеется огромное количество исследований гена *TNFα* в связи с эндокринными [14], бронхолегочными [15], нервно-психическими заболеваниями [16], гематологией [17], патологией опорно-двигательного аппарата [18], желудочно-кишечного тракта [19] и мочевыделительной системы [20].

Полученные нами данные по частотам встречаемости аллелей и генотипов риска гена *TNFα* у жителей Беларуси могут быть в дальнейшем использованы для изучения вклада данного фактора в развитие различных патологий.

Список использованных источников

1. Фрейдлин, И.С. Иммунная система и ее дефекты / И.С. Фрейдлин. — Санкт-Петербург: НТФФ Полисан, 1998. — 116 с.

2. Innate immunity *SNPs* are associated with risk for severe sepsis after burn injury / C. Robert [et al.] // Clinical Medicine & Research. — 2006. — Vol. 4. — № 4. — P. 250—255.

3. Mathew, C.C. The isolation of high molecular weight eukaryotic *DNA* / C.C. Mathew // Meth. Mol. Biol., Human Press. — 1984. — Vol. 2. — Walker J.M., (ed). — P. 31—34.

4. Association between polymorphism of tumour necrosis factor α-308 gene promoter and asthma: a meta-analysis / J. Gao [et al.] // Thorax. — 2006. — Vol. 61. — P. 466—471.

5. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation / A.G. Wilson [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — V. 94. — P. 3195—3199.

6. Виноградова, С.В. Роль полиморфизма генов цитокинов в развитии заболеваний печени / С.В. Виноградова // Сучасна гастроентерологія. — 2004. — № 5 (19). — С. 15—20.

7. Пузырев, В.П. Генетическое разнообразие народонаселения и болезни человека / В.П. Пузырев, М.Б. Фрейдин, А.Н. Кучер. — Томск: Печатная мануфактура, 2007. — 320 с.

8. Коненков, В.И. Ассоциированность аллелей (*G*-308*A*) гена *TNFα* с пролиферативными и диспластическими процессами при атопиче-

Национальная академия наук Беларуси

ском дерматите / В.И. Коненков [и др.] // Генетика человека и патология: сборник научных трудов / ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН; под ред. В.П. Пузырева. — Томск, 2007. — Вып. 8. — С. 85.

9. Макеева, О.А. Структурно-функциональная организация наследственной компоненты подверженности к гипертрофии миокарда у человека: автореф. дис. …канд. биол. наук: 03.00.26 / О.А. Макеева; РАМН. — Томск, 2004. — 24 с.

10. The human tumor necrosis factor (*TNF*)-alpha —308 *GA* promoter polymorphism is related to prenatal growth and postnatal insulin resistence / P. Casano-Sancho [et al.] // Clin. Endocrinol. — 2006. — Vol. 64. — P. 129—135.

11. Назаренко, М.С. Ассоциация полиморфного варианта *G*-308*A* фактора некроза опухоли-альфа с жизнеспособностью эмбрионов человека / М.С. Назаренко [и др.] // Генетика человека и патология: сборник научных трудов / ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН; под ред. В.П. Пузырева. — Томск, 2007. — Вып. 8. — С. 241.

12. Polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha gene in women with preeclampsia / J. Heiskanen [et al.] // J. of Associated Reproduction and Genetics. — 2002. — Vol. 19, № 5. — P. 220—223.

13. Фадюшина, С.В. Роль полиморфных вариантов генов, ответственных за функционирование эндотелиальной системы, в развитии гестоза / С.В. Фадюшина, Л.П. Назаренко // Генетика человека и патология: сборник научных трудов / ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН; под ред. В.П. Пузырева. — Томск, 2007. — Вып. 8. — С. 133.

14. TNFα polymorphism and type 2 diabetes mellitua in Taiwanese patient // M.Y. Shiau [et al.] // Tissue Antigens. — 2003. — Vol. 61. — P. 393–397.

15. Association of human tumor necrosis factor polymorphism with asthma and serum total JgE / H.D. Shin [et al.] // Human Molecular Genetics. — 2004. — Vol. 13. — P. 397—403.

16. Association analysis of the *G*-308*A* promoter polymorphism of the tumor necrosis factor (*TNF*-alpha) gene in Japanese patients with schizophrenia / R. Hashimoto [et al.] // J. Neural. Transm. —2004. — Vol. 111. — P. 217—221.

17. Genetic polymorphism in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkins lymphoma outcome / K. Warzocha [et al.] // Blood. — 1998. — Vol. 91. — P. 3574—3581.

18. Coplex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis / B. Miterski [et al.] // BMC Genet. — 2004. — Vol. 5, № 2. — P. 218—231.

19. Association of *TNF*-alpha promoter polymorphism with the clearance of hepatitis *B* virus infection / Y. Kim [et al.] // Hum. Mol. Gen. — 2003. — Vol. 12. — P. 2541–2546

20. Association of *IL*-1beta, *IL-1RA* and *TNFα* gene polymorphism in childhood nephritic syndrome / S.D. Kim [et al.] // Pediatr. Nephrol. — 2004. — Vol. 19, № 3. — P. 295.

Дата поступления статьи 8 апреля 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 574.3:575.24/.25:616.151.5

А.Л. Гончар, И.Б. Моссэ, Д.В. Савчин

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМОВ THR312ALA И VAL34LEU КАК ФАКТОРОВ РИСКА ИНФАРКТА МИОКАРДА

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Проблема артериальных тромбозов и осложнений, связанных с ними, таких как инфаркты, инсульты, тромбоэмболии, является очень острой, так как занимает первое место в мире в структуре смертности в развитых странах. При всем при этом, не смотря на то, что биохимические механизмы, приводящие к развитию артериальных тромбозов, изучены достаточно хорошо, часто вызывает недоумение тот факт, что при одних и тех же внешних условиях у одних людей происходит развитие артериального тромбоза, а у других — нет.

Ранее считалось, что заболевания данного рода большей своей частью вызываются факторами внешней среды, такими как возраст человека, его образом жизни (курение, переедание, малая подвижность), однако исследования, проводимые на близнецах и близких родственниках, показали, что наследуемые факторы риска также вносят существенный вклад в развитие и степень тяжести заболеваний, связанных с артериальными тромбозами[1]. В последнее время исследование именно наследственных факторов вышло на первый план при изучении проблемы артериальных тромбозов.

Существует два направления изучения наследственной предрасположенности к повышенному тромбообразованию: идентификация новых генетических факторов риска и изучение влияния уже установленных факторов. При идентификации новых факторов в первую очередь рассматривают такие изменения в геноме, при которых происходит изменение продукции, активности, биодоступности, функции или метаболизма компонентов гемостаза или антигемостаза, что в свою очередь смещает гемостатическое равновесие в сторону повышенного тромбообразования. При обнаружении такого изменения в структуре гена, этот ген получает название «гена-кандидата». При изучении влияния уже установленных факторов риска используют методы анализа типа «случай-контроль» для выявления вклада данного фактора в общую картину заболеваемости и степени тяжести заболевания связанного с этим фактором.

К настоящему времени выявлено несколько десятков генетических вариантов, носительство которых ассоциировано с развитием протромботических сдвигов в системе гемостаза и/или риском атеротромбоза. Большинство из них кодирует компоненты плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза. Однако, существует множество вопросов относительно их участия в патогенезе различных клинических проявлений и целесообразности диагностики этих мутаций в практических целях. Сложившаяся ситуация во многом объясняется многофакторной природой атеротромбоза и сложным характером взаимодействия генетических и экзогенных факторов риска, лежащих в основе или провоцирующих развитие патологических сдвигов в системе гемостаза. Эпидемиологические исследования указывают также на возможность неодинакового вклада тех или иных факторов (в том числе, генетических) в патогенез атеротромбоза у представителей различных популяционных групп.

Необходимость использования принципиально новых подходов при изучении основ генетической предрасположенности к тромбозу диктуется существующей на сегодняшний день концепцией о полигенном характере тромбофилии, которая постулирует наличие не одного, а нескольких генетических вариантов модифицирующих риск развития заболевания. В этой связи, особый интерес уделяется явлению аллельного полиморфизма, которое присуще

Национальная академия наук Беларуси

большинству генов человека, в том числе, тем, продукты которых вовлечены в регуляцию физиологического тока крови.

Наиболее тесно связанным с артериальными тромбозами среди всех компонентов коагуляционного каскада является повышенный уровень содержания фибриногена в крови. Высокие уровни данного фактора свертывания крови способствуют образованию фибриновых сгустков с порами меньшего чем в норме диаметра и состоящими из более тонких и плотноупакованных нитей. Уровни фибриногена в крови коррелируют с традиционными факторами риска, такими, как гипертензия, курение, диабет, неподвижный образ жизни, возраст [2].

Обнаружены генетические дефекты, приводящие к нарушению структуры любой из трех цепей фибриногена. Наиболее изученным является полиморфизм 455G/A β-цепи фибриногена, и сообщается, что генотип 455AA встречается в 10-20 % популяции и коррелирует с уровнем фибриногена, который на 10 % выше, чем у людей с генотипом 455GG [3].

Помимо полиморфизма 455G/A β-цепи фибриногена также известен полиморфизм гена α-цепи фибриногена, приводящий к замене аминокислоты треонина на аланин в положении 312 (Thr312Ala). Этот полиморфизм расположен близко к сайту связывания с фактором XIII, находящемся в позиции 328. Учитывая положение полиморфизма Thr312Ala, можно предположить его влияние на прочность и эластичность тромба.[4].

На завершающей стадии коагуляционного каскада большую роль в образовании тромба играет фактор XIII. После активации он катализирует образование ковалентных связей между α и γ цепями фибрина, стабилизируя фибриновый сгусток. Самым распространенным полиморфизмом фактора XIII является полиморфизм Val34Leu, который возникает вследствие замены гуанина на тимин во втором экзоне гена, кодирующего α-субъединицу фактора XIII. Эта замена в свою очередь приводит к тому, что в положении 34 полипептидной цепи, всего в 3 аминокислотных остатках от активного центра, аминокислота валин (Val) меняется на лейцин (Leu). Обнаружено, что активация фактора XIII тромбином в плазме крови у носителей полиморфизма *34Leu* происходит в 2-3 раза быстрее. Это в свою очередь оказывает влияние на стабильность тромба таким образом, что при наличии полиморфизма Leu 34 фибрин имеет более качественную структуру с более тонкими фибриллами и более мелкими порами. В некоторых исследованиях показана защитная роль аллеля Leu против атеротромбозов по сравнению с нормальным аллелем [2,5].

В связи с тем, что имеющиеся в научной литературе данные по генетической предрасположенности к артериальным тромбозам отрывочны и противоречивы, целью данной работы является исследование полиморфных вариантов генов Val34Leu и Thr312Ala как возможных факторов риска развития инфаркта миокарда.

Материалы и методы

В качестве биологического материала мы использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов крови или экстрагированную из высушенных пятен крови. Образцы крови больных с инфарктом миокарда были получены в ГУ РНПЦ «Кардиология», в качестве контроля использовались образцы ДНК случайной выборки жителей города Минска. В случае определения полиморфизма Val34Leu в качестве контроля использовалась ДНК людей старше 50 лет без выявленной сердечно-сосудистой патологии. Всего было обследовано на полиморфизм Val34Leu 74 образца ДНК пациентов с инфарктом миокарда, 109 образцов ДНК контрольной группы; на полиморфизм Thr312Ala-53 образца пациентов с инфарктом миокарда, 127 образцов контрольной группы.

Для определения аллелей полиморфизма альфа-цепи фибриногена Thr312Ala используется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом. ПЦР проводится в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 100 нг ДНК, 1×ПЦР буфер, 2 мМ MgCl2, 200 мкМ dNTP, по 10 пМ праймеров, 1 ЕД Taq полимеразы.

Условия проведения ПЦР были следующими: после денатурации образцов при 95°С в течение 5 минут следуют 35 циклов амплификации при следующих температурно-временных услови-

Национальная академия наук Беларуси

ях: денатурация при 95°С — 1 мин; отжиг при 64°С — 1 мин и синтез при 72°С — 1 мин. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживаются в течение 5 мин при 72°С.

После амплификации продукты ПЦР подвергаются рестрикции с использованием эндонуклеазы RsaI в течение 8 часов. Электрофоретическое разделение полученных фрагментов ДНК проводится в 8 %–ом полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием (Рис.1).

Из-за наличия двух постоянных сайтов рестрикции в случае аллеля Ala312 выявляются три фрагмента ДНК с длиной 25, 48 и 117 пар оснований. В случае аллеля Thr312 формируется дополнительный сайт (Рис. 1, отмечен*), в результате чего вместо фрагмента в 117 пар оснований формируются фрагменты длиной 78 и 39 пар оснований.

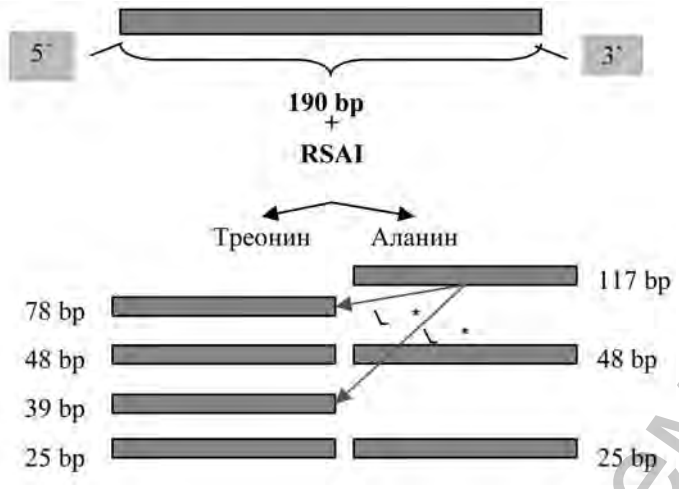


Рис.1. Схема рестрикции 190 bp продукта амплификации рестриктазой Rsa I.

Для определения аллелей фактора XIII использовали метод ARMS ПЦР, который состоит из двух полимеразных цепных реакций. В первой реакции применяется обратный праймер, комплементарный нормальной ДНК-последовательности (5`-cacagtggagcttcagagcg-3`), а во второй обратный праймер, комплементарный мутантной ДНК (5`-cccacagtggagcttcagagct-3`). Прямой праймер для обеих реакций одинаковый (5`-ctggacccagagtggtgg-3`). Индивидуальный генотип определяется по наличию продуктов ПЦР. При отсутствии мутации амплификация проходит только в первой реакции, а при гомозиготном носительстве мутации — только во второй. У гетерозиготных носителей продукт ПЦР образуется в двух реакциях.

Реакционная смесь с конечным объемом 20 мкл содержит 100 нг ДНК, 1×ПЦР буфер, 1.5мМ MgCl2, 200 мкМ dNTP, по 5 пМ праймеров, 1 ЕД Taq полимеразы. После денатурации образцов при 94° С в течение 5 минут проводится 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 1 мин денатурации при 94°С; 30 с отжига при 56°С и 30 с синтеза при 72°С. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживали в течение 10 мин при 72°С.

Разделение продуктов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 2-процентном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (Рис. 2).

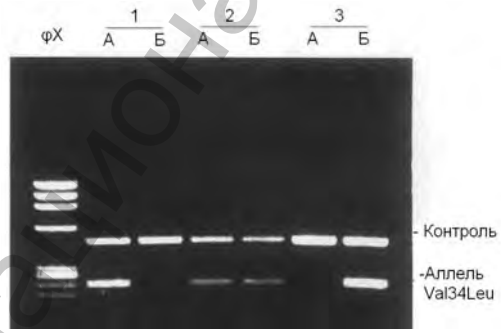


Рис. 2 . Результат ПЦР для трех образцов. Образцы 1, 2 и 3 — норма, гетерозигота и гомозигота соответственно. А — ПЦР реакция с нормальным и Б — ПЦР реакция с мутантным праймером.

Национальная академия наук Беларуси

Результаты и обсуждение

Полученные результаты представлены в таблицах 1—4:

Таблица 1

Распределение генотипов полиморфизма Thr312Ala у больных с инфарктами миокарда и в контрольной группе.

Генотип	Больные с инфарктами миокарда		Контрольная группа	
	Абсолютное число	Процент	Абсолютное число	Процент
TT **AT** **AA**	29 23 1	54,7 43,4 1,9	104 20 3	81,9 15,7 2,4
Всего	53	100	127	100

Таблица 2

Частоты аллелей полиморфизма Thr312Ala у больных с инфарктами миокарда и в контрольной группе

Аллели	Больные с инфарктами миокарда		Контрольная группа	
	Количество хромосом	Процент	Количество хромосом	Процент
T **A**	81 25	76,4 23,6	228 26	89,7 10,3
Всего	106	100	254	100

Таблица 3

Распределение генотипов полиморфизма Val34Leu у больных с инфарктами миокарда и в контрольной группе

Аллели	Больные с инфарктами		Контрольная группа	
	Абсолютное число	Процент	Абсолютное число	Процент
Val/Val **Val/Leu** **Leu/Leu**	35 34 5	47,3 45,9 6,8	47 58 4	43,1 53,2 3,7
Всего	74	100	109	100

Таблица 4

Частоты аллелей полиморфизма Val34Leu у больных с инфарктами миокарда и в контрольной группе

Аллели	Больные с инфарктами миокарда		Контрольная группа	
	Количество хромосом	Процент	Количество хромосом	Процент
T **A**	104 44	70,3 29,7	152 66	69,7 30,3
Всего	148	100	218	100

Национальная академия наук Беларуси

Из таблиц видно, что результаты исследования для описанных ранее полиморфизмов существенно различаются. Так, если для полиморфизма Thr312Ala в группе с инфарктами миокарда частота встречаемости альтернативного аллеля в 2,3 раза выше встречаемости этого же аллеля в контрольной группе, то в случае полиморфизма Val34Leu частоты в группе с инфарктами и контрольной группе практически совпадают.

В научной литературе опубликованы различные сведения о связи полиморфизма Thr312Ala с генетической предрасположенностью к сердечно-сосудистым заболеваниям. Например, в работе [4] было показано влияние данного полиморфизма на выживаемость пациентов, перенесших инфаркт миокарда. Оказалось, что смертность пациентов с синусовым ритмом не зависит от наличия того или иного варианта гена, но у людей с фибрилляцией предсердий, гомозиготных по аллелю Thr312, выживаемость после инфаркта выше в 2,3 раза, чем у пациентов гетерозиготных по аллелю Ala312. Однако, эти данные не были подтверждены в работе [6].

Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день авторские данные по полиморфизму Thr312Ala недостаточны для однозначного установления связи полиморфизма с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний и, в частности, инфаркта миокарда. При оценке результатов, свидетельствующих о предрасположенности к тромбообразованию, обуславливаемой тем или иным генным вариантом, необходимо учитывать мультифакторную природу рассматриваемых заболеваний и возможность кумулятивного влияния нескольких генов, а также факторов внешней среды на увеличение риска развития артериальных тромбозов.

Полученные нами данные о том, что частота встречаемости аллеля А полиморфизма Thr312Ala у больных с инфарктом миокарда в 2,3 раза выше, чем в контрольной случайной выборке, являются дополнительным свидетельством влияния данного полиморфизма на генетическую предрасположенность к инфаркту миокарда.

Что же касается полиморфизма Val34Leu, то согласно полученным нами данным, этот вариант гена не оказывает существенного влияния на риск возникновения инфаркта миокарда. В то же время, хорошо известно, что замена валина на лейцин, обусловленная данным полиморфизмом, резко меняет структуру фибриновых волокон[5] что, казалось бы, должно влиять на тромбирование кровеносных сосудов. Тем не менее, полученные нами результаты не позволяют сделать однозначных выводов о роли данного полиморфизма в процессе тромбообразования.

Заключение

В результате проведенного молекулярно-генетического исследования влияния полиморфизмов Thr312Ala и Val34Leu на наследственную предрасположенность к инфарктам миокарда показано, что замена треонина на аланин в молекуле α-цепи фибриногена приводит к повышению риска возникновения данного заболевания в 2,3 раза. В то же время, замена валина на лейцин, обусловленная полиморфизмом Val34Leu, не оказывает существенного влияния на риск возникновения инфаркта миокарда.

Список использованных источников

1. Rosenberg, R. Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states / R. Rosenberg, W. Aird // N Engl J Med. — 1999. — Vol. 340. — P. 1555—1564.

2. Genetic aspects of ischemic stroke / S. Stankovic [et al.] // Jugoslov Med Biohem. — 2005. — Vol.24. — P. 225— 239.

3. Voetsch, B. Genetic determinants of arterial thrombosis / B. Voetsch, J. Loscalzo // Arterioscler ThrombVasc Biol. — 2004. — Vol. 24. — P. 216— 229.

4. Association of the a-Fibrinogen Thr312Ala Polymorphism With Poststroke Mortality in Subjects With Atrial Fibrillation / A.M. Carter [et al.] // Circulation. — 1999. — Vol. 99. — P. 2423–2426.

5. Factor XIII Val34Leu variant is protective against venous thromboembolism: a HuGE review and meta-analysis / Philip S. Wells [et al.] // Am. J. Epidemiol. — 2006. — Vol.164. — P. 101— 109.

6. The α-fibrinogen T/A312 polymorphism in the ECTIM study / J. M. Curran [et al.] // Thromb Haemost. — 1998. Vol. 79. — P. 1057— 1058.

Дата поступления статьи 8 апреля 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 576.54+577.21

П.М. Морозик, И.Б. Моссэ

РОЛЬ ГОРМОНА МЕЛАТОНИНА В РЕГУЛЯЦИИ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ ПЕРЕДАЧИ ИНФОРМАЦИИ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

На современном этапе развития науки выявлено явление передачи информации от облученных клеток необлученным. Природа этой информации, как и механизмы ее передачи, неизвестны [1]. Данное явление получило название «bystander effect». Появление повреждений в необлученных клетках свидетельствует о существовании внемишенных эффектов и опровергает классические представления радиобиологии. Предполагается, что главной функцией этого эффекта является уменьшение риска трансформации клеток в многоклеточном организме, подвергшемся облучению, поскольку одиночные клетки внутри ткани не всегда способны реагировать на облучение, а интегрированная многоклеточная система способна ответить на облучение удалением функциональной группы клеток, которые могли бы быть трансформированы, например, в раковые клетки.

Существует два предположения о возможных механизмах данного явления — через межклеточные взаимодействия или путем секреции факторов (например, цитокинов) в культуральную среду. Считается, что повреждающий фактор обладает белковой природой, так как он термолабилен, не теряет эффекта при замораживании, а при воздействии ингибиторами белков радиационно-индуцированный «байстэндер» эффект (РИБЭ) не формируется [2,3].

Было также показано, что данный эффект может быть индуцирован различными способами: α-частицами [4], γ-облучением [5], при смешивании необлученных клеток с клетками, меченными радиоактивными метками [6] и даже лазерным излучением [7]. Кроме того, независимо от типа радиационного воздействия РИБЭ был показан на различных типах клеток. Более того, в последние годы появились свидетельства существования РИБЭ *in vivo* [8—9]. Ранее нами было показано, что повреждающие РИБЭ факторы, индуцированные *in vivo*, циркулируют в крови облученных в результате аварии на ЧАЭС людей даже через 20 лет после аварии [10].

Понимание эффектов радиации как скоординированного многоклеточного ответа, поражающего не только облученные, но и необлученные клетки, поможет определить вклад этих эффектов в оценку радиационных рисков. В результате, при оценке радиационного риска во всех моделях канцерогенеза однозначно должны приниматься во внимание не только мишенные, но и немишенные аспекты радиационного воздействия.

Таким образом, исследование механизмов межклеточных взаимодействий является актуальным как для решения фундаментальных проблем биологии, так и с практической точки зрения, в частности, для расчетов радиационных рисков, а также для радиационной терапии рака.

Одним из способов исследования механизмов РИБЭ является исследование влияния модификаторов на «байстэндер» эффект, что поможет сделать вывод о его механизме и природе вызывающих его факторов.

В настоящем исследовании при индукции РИБЭ путем переноса донорской среды от γ-облученных клеток необлученным в качестве модифицирующего агента использовался нейрогормон шишковидной железы эпифиза мелатонин. Мелатонин в организме обладает множеством функций, одной из которых является антиоксидантная [11]. Во многих исследованиях были показаны радиозащитные свойства мелатонина [12,13].

Национальная академия наук Беларуси

Материалы и методы

Клеточная культура. Клеточная линия HPV-G клеток — кератиноциты человека, иммортализованные трансфекцией вируса папилломы человека, вследствие чего клетки являются мутантными по *p53*. Они растут в культуре с формированием монослоя, при этом отсутствуют межклеточные контакты. HPV-G клетки культивировали в среде Дульбекко DMEM: F12 (1:1) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 1 % пенициллина-стрептомицина, 1 % L-глютамина и 1 μг/мл гидрокортизона. Клетки инкубировали в термостате при 37°С в условиях 95 % влажности и 5 % содержании двуокиси углерода и пересевали трипсинизацией каждые 8—10 дней.

Модификатор. Синтетический мелатонин (Сигма, Германия) представляет собой белый порошок. Мелатонин вводили в клеточную среду в концентрации 10 мг/мл за 30-60 мин до облучения либо через 1 час после облучения в донорскую культуральную среду от облученных клеток перед фильтрацией и переносом клеткам-реципиентам.

Облучение. HPV-G клетки облучали дозой 0,5 Гр при комнатной температуре через 12—24 часа после посева с помощью кобальтовой пушки (терапевтический источник ^{60}Co) с мощностью дозы 1,9 Гр/мин на расстоянии 80 см от источника в 25 см^2 пластиковых флаконах либо на стеклянных покровных стеклах (диаметром 23 мм).

Колониеобразующий тест. После трипсинизации, производили подсчет количества клеток в 1 мл клеточной суспензии с помощью автоматического счетчика-анализатора числа клеток (Coulter Z1) и проводили посев необходимого количества клеток в 25 см^2 пластиковые флаконы (NUNC, США). Эксперимент состоял из трех вариантов опытов: прямого облучения, доноров «байстэндер» эффекта и реципиентов «байстэндер» эффекта. Посев во флаконы доноров РИБЭ составлял $0{,}5\times10^6$ клеток, реципиентов РИБЭ и прямого облучения — 300 клеток. Каждый тип флаконов состоял из 1) контроля; 2) контроль + мелатонин; 3) облучение и 4) облучение + мелатонин. После посева, клетки инкубировали при 37°С в термостате в течение 12 часов, затем флаконы прямого облучения и доноров РИБЭ облучали и через 1 час после облучения (в течение которого выделился в культуральную среду РИБЭ фактор) изолировали донорскую среду и вносили в нее радиопротектор на 30—60 мин. Затем после фильтрации через 0,22 мкм стерильные шприцевые фильтры (Nalgene, США) донорскую среду переносили во флаконы к клеткам-реципиентам РИБЭ. Через 9—10 дней инкубирования (после формирования колоний) клетки затем окрашивали карболовым фуксином и подсчитывали число колоний.

Полученные данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка во всех случаях. Проводили проверку распределения, и так как оно было нормальным — достоверность определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

В расчетах использовали следующие понятия и формулы:

• параметр «эффективность посева» (ЭП) — это отношение числа посеянных *in vitro* клеток к количеству сформированных колоний, и представляется в виде процента конечного числа образованных колоний к числу изначально посеянных клеток.

• параметр «выжившая фракция» (ВФ) рассчитывается как отношение эффективности посева облученных клеток к эффективности посева контрольных клеток (в %).

Микроядерный тест. Во флаконы прямого облучения и реципиентов РИБЭ производили посев около 6000 клеток на стеклянные покровные стекла (диаметр 23 мм), которые помещали в чашки Петри (диаметр 60 мм, NUNC, США) в 1 мл культуральной среды на 6 часов. Затем, после того как клетки прикреплялись к покровному стеклу, добавляли еще 5 мл культуральной среды. Клетки — доноры РИБЭ были посеяны в количестве $0{,}5\times10^6$ во флаконах объемом 25 см^2 (NUNC, США). Каждая линия экспериментов состояла из 1) контроля; 2) контроль + радиопротектор; 3) облучение и 4) облучение + радиопротектор. После облучения и выделения фактора, вызывающего РИБЭ, среду от облученных клеток-доноров изолировали и вносили радиопротектор, через 30—60 мин фильтровали и заменяли ею культуральную среду клеток-реципиентов. При прямом облучении радиопротектор вводили

Национальная академия наук Беларуси

за 30—60 мин до облучения. Через 1,5 часа вносили цитохалазин Б (7 мкг/мл), после чего клетки вновь инкубировали 24 часа. Затем клетки промывали в PBS, фиксировали охлажденным раствором Карнуа (1 часть ледяной уксусной кислоты и три части метанола) по 10—15 мл три раза по 10—20 мин, покровные стекла высушивали и окрашивали 10 % раствором красителя по Романовскому-Гимзе. С помощью покровной среды (Sigma, Германия) стекла приклеивали к предметным стеклам. Подсчет микроядер производили под инвертированным микроскопом (×400 увеличение) только в биядерных клетках (анализировали минимум 1000 биядерных клеток в одном препарате). Данные представлены в виде частоты микроядер/клеток с микроядрами на 1000 биядерных клеток ± стандартная ошибка.

Результаты и обсуждение

Модифицирующее действие мелатонина изучали на культуре клеток кератиноцитов человека, иммортализованных вирусом папилломы человека. Мелатонин в донорскую среду вводили после облучения перед фильтрацией, так как только в таком случае он не влияет на клетки при прямом облучении и не попадает во флаконы к клеткам-реципиентам после фильтрации.

В таблице 1 представлены результаты изучения влияния мелатонина на выживаемость кератиноцитов человека при прямом облучении и РИБЭ.

Приведенные данные указывают, что не наблюдается какого-либо значительного эффекта мелатонина на интактные HPV-G клетки: число образовавшихся колоний во флаконах контрольных клеток с мелатонином практически не отличается от контрольных значений ($p>0,05$ — разница недостоверна), то есть мелатонин не обладает цитотоксическим или стимулирующим колониеобразующую способность эффектом.

Таблица 1

Эффект мелатонина (Мт) на выживаемость HPV-G клеток при прямом облучении и «байстэндер» эффекте

		Клеток посеяно	Среднее число колоний	P	ЭП, %	ВФ, %
Прямое облучение	Контроль	300	149±2,3	-	50±0,8	100±0,0
	Мелатонин	300	150±3,5	> 0,05	50±1,2	100±1,6
	0,5 Гр	300	97±3,2	< 0,01	32±1,1	65±3,2
	0,5 Гр +Мт	300	123±2,3	< 0,01	41±0,8	82±1,6
РИБЭ	Контроль	300	150±0,8	-	50±0,3	100±0,0
	Мелатонин	300	150±2,9	> 0,05	50±1,0	100±2,3
	0,5 Гр	300	118±3,8	< 0,01	39±1,3	79±3,0
	0,5 Гр +Мт	300	132±3,5	< 0,01	44±1,2	88±2,8

При прямом облучении наблюдалось значительное снижение выживаемости HPV-G клеток (на 26 % по сравнению с контролем, $p<0,01$). При переносе среды от облученных клеток клеткам-реципиентам был выявлен РИБЭ — выживаемость снизилась на 20 % ($p<0,01$). Введение мелатонина в питательную среду облученных клеток привело к значительному повышению уровня выживаемости (на 12 % по сравнению с клетками, облученными без мелатонина, $t=4,84$; $p<0,01$), что свидетельствует о радиозащитном эффекте этого гормона.

Национальная академия наук Беларуси

В экспериментах по индукции РИБЭ, введение мелатонина в донорскую среду также способствовало повышению выживаемости в клетках-реципиентах, однако не так значительно, как при прямом облучении — на 9 % по сравнению с реципиентами, на которые воздействовали средой от облученных без мелатонина клеток (t=2,16; p<0,05).

Таким образом, мелатонин способен снижать повреждающее действие «байстэндер» фактора на выживаемость HPV-G клеток уже после его индукции.

Ранее было показано [5], что культуральная среда, облученная без клеток, не оказывает эффекта на выживаемость необлученных клеток. Это исключает возможность того, что гидролиз среды способствует формированию свободных радикалов, участвующих в процессе клеточного повреждения. Кроме того, промежуток времени, через который культуральная среда переносится клеткам-реципиентам, исключает возможность индукции клеточной гибели короткоживущими радикалами.

Микроядерный тест в настоящей работе использовался с целью изучения способности мелатонина модифицировать при облучении структуру и сегрегацию хромосом, приводящих к индукции микроядер (МЯ) в интерфазных клетках.

На рисунке (Рис.1) представлены результаты, полученные при изучении модифицирующего эффекта мелатонина на кератиноциты человека при прямом действии радиации и «байстэндер» эффекте с помощью микроядерного теста.

Как видно из рисунка 1, прямое действие радиации и донорская среда (от облученных клеток) индуцируют формирование микроядер в HPV-G клетках. Средняя частота микроядер в контрольных клетках (75,33±6,81 ‰ и 76,67±6,87 ‰, соответственно) значительно ниже, чем средняя частота микроядер в облученных клетках (230,00±10,87‰ и 149,67±9,21 ‰, соответственно). При сравнении с контролем, у мелатонина не наблюдается индуцирующей или ингибирующей формирование микроядер способности — среднее число микроядер в клетках, на которые воздействовали только мелатонином, практически не отличается от контроля (74,67±6,79 ‰ и 76,00±6,84 ‰; разница недостоверна).

Общая частота микроядер в облученных клетках в присутствии мелатонина и при переносе донорской среды с мелатонином клеткам-реципиентам (136,00±8,85 и 106,00±7,95) оказалась ниже, чем в клетках, подвергшихся воздействию прямого облучения или переносу донорской среды без мелатонина (t=6,7 и t=3,59, соответственно; p<0,01 в обоих случаях) — следовательно, и по этому тесту также наблюдался высокодостоверный защитный эффект мелатонина как при прямом облучении, так и при «байстэндер» эффекте (116,01±8,27 и 91,33±7,44, соответственно; t=6,07 и t=3,19, p<0,01 в обоих случаях).

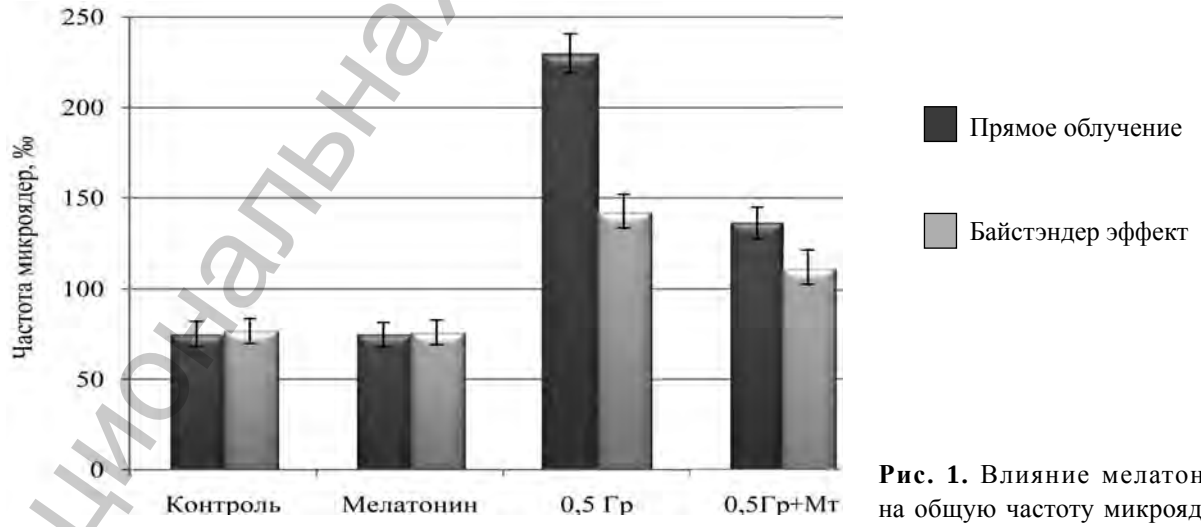


Рис. 1. Влияние мелатонина на общую частоту микроядер в HPV-G клетках при прямом облучении и РИБЭ.

Национальная академия наук Беларуси

В целом, эксперименты с использованием колониеобразующего и микроядерного тестов свидетельствуют о том, что можно снижать эффект межклеточной передачи информации от облученных клеток необлученным с помощью мелатонина. Причем мелатонин оказался эффективным при защите клеток как от прямого действия радиации, так и при «байстэндер» эффекте. Тем не менее, мелатонин более эффективно снижает эффекты прямого облучения, чем «байстэндер» эффекта. Мелатонин обладает очень выраженным антиоксидантным действием. Это свойство, возможно, и является основной причиной снижения «байстэндер» эффекта.

В предыдущих исследованиях нами в качестве модификаторов РИБЭ использовались радиопротекторы меланин и α-токоферол [14,15]. Они также были более эффективны при прямом облучении, чем при РИБЭ. При этом мелатонин из всех радиопротекторов оказался наиболее эффективным. Это, возможно, связано с тем, что мелатонин способен к активации ферментов, участвующих в антиоксидантной защите клеток, и повышает эффективность электронтранспортной цепи. Он является жирорастворимым и немного водорастворимым, что способствует легкому проникновению через все биологические мембраны и нейтрализации свободных радикалов одновременно в липидном и водном окружении клеточных мембран, а также способен накапливаться в клеточном ядре в большей концентрации, чем в цитоплазме.

Заключение

Анализ изучения влияния мелатонина на выживаемость и частоту микроядер в культивируемых кератиноцитах человека при прямом облучении и «байстэндер» эффекте позволяет сделать вывод о том, что мелатонин способен модифицировать «байстэндер» эффект, нейтрализуя повреждающие факторы, находящиеся в донорской культуральной среде. Учитывая, что мелатонин обладает выраженными антирадикальными свойствами, можно предположить, что механизмы РИБЭ имеют радикальную природу или радикальный компонент.

Список использованных источников

1. Morgan, W.F. Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells / W.F. Morgan, M.B. Sowa // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — Vol. 102, № 40. — P. 14203—14208.

2. Mothersill, C. Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium / C. Mothersill, C.B. Seymour // Radiat. Res. — 1998. — Vol. 149, № 3. — P. 256—262.

3. Alpha particles induce the production of interleukin-8 by human cells / P.K. Narayanan [et al.] // Radiat. Res. — 1999. — Vol. 152, № 1. — P. 57—63.

4. Nagasawa, H. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles / H. Nagasawa, J.B. Little // Cancer Res. — 1992. — Vol. 52. — P. 6394—6396.

5. Mothersill, C. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells / C. Mothersill, C. Seymour // Int. J. Radiat. Biol. — 1997. — Vol. 71. — P. 421—427.

6. Howell, R.W. Bystander effects caused by non-uniform distributions of DNA incorporated ^{125}I / R.W. Howell, A. Bishayee // Micron. — 2002. — Vol. 33. — P. 127—132.

7. Моссэ, И.Б. Индукция «байстэндер» эффекта лазерным излучением / И.Б. Моссэ, П.М. Морозик, Т.В. Ксензова // Сахаровские чтения 2007 года: экологические проблемы XXI века: материалы 7-й Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 17–18 мая 2007 г. / МГЭУ им. А.Д. Сахарова; редкол.: С.П. Кундас [и др.]. — Минск, 2007. — С. 68—69.

8. Radiation abscopal anti-tumour effect is mediated through p53 / K. Camphausen [et al.] // Cancer Res. — 2003. — Vol. 63. — P. 1990— 1993.

9. Bystander effect produced by radiolabeled tumour cells *in vivo* / L.Y. Xue [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99, № 21. — P. 13765—13770.

Национальная академия наук Беларуси

10. Bystander effects induced by serum from survivors of the Chernobyl accident / P. Marozik [et al.] // ExP. Hematol. — 2007. — Vol. 35, № 4, Suppl. 1. — P. 55—63.

11. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin / D.X. Tan [et al.] // J. Pineal Res. — 2003. — Vol. 34, № 1. — P. 75—78.

12. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics / Vijayalaxmi [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2002. — Vol. 20, № 10. — P. 2575—2601.

13. Yilmaz, S. Effects of melatonin and vitamin E on oxidative-antioxidative status in rats exposed to irradiation / S. Yilmaz, E. Yilmaz // Toxicology. — 2006. — Vol. 222, № 1–2. — P. 1—7.

14. Protection by chemicals against radiation-induced bystander effect / P. Marozik [et al.] // Multiple stressors — a challenge for the future: Proceedings of the NATO advanced research workshop, Minsk, 1-5 October 2006 / Springer; editors: C. Mothersill [et al.]. — Dordrecht, 2007. — P. 247—262.

15. Melanin influence on bystander effect in human keratinocytes / I. Mosse [et al.] // Mutat. Res. — 2006. — Vol. 597, № 1-2. — P. 133—137.

Дата поступления статьи 7 апреля 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 577.21:575

Р.И. Гончарова, Т.Д. Кужир, Н.В. Савина, М.П. Смаль

ИНДУЦИРОВАННАЯ ГЕНОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ КАК ФАКТОР ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ. ОЦЕНКА ЦЕЛОСТНОСТИ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Связь заболеваемости с геномной нестабильностью. Открытие феномена индуцированной геномной нестабильности стало впечатляющим достижением современной биологии, которое уже оказывает влияние на развитие новых подходов к охране здоровья населения в изменяющихся экологических условиях. Нестабильность генома характеризуется повышенным по сравнению с обычно наблюдаемым уровнем мутаций, который поддерживается в отдаленные сроки после острого или при хроническом мутагенном воздействии как у данного организма, так и у его потомства [1–6]. Одновременно отмечается снижение порога чувствительности к действию неблагоприятных факторов среды [5, 6]. Проявления геномной нестабильности обнаружены на клеточном и организменном уровнях у разных видов, в том числе у человека, что указывает на универсальность этого феномена. Нестабильное состояние генома может вызываться в соматических и половых клетках мутагенными факторами разной природы и длительное время передаваться в ряду поколений.

Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о вкладе геномной нестабильности в развитие патологических состояний и общую заболеваемость населения. Генетически детерминированная хромосомная нестабильность, обусловленная мутациями в различных генах репарации ДНК, приводит к возникновению у человека тяжелых наследственных синдромов, для которых характерна высокая предрасположенность к злокачественным новообразованиям [7–9]. Индуцированная геномная нестабильность, возникающая в результате антропогенного загрязнения окружающей среды, сопровождается увеличением частоты мутаций в любых генах, в том числе ответственных за репарацию ДНК, опухолевую трансформацию клеток, сигнальные пути ответа на стрессовые воздействия. Как следствие, повышается чувствительность генома к неблагоприятным факторам, происходит ослабление защитных реакций и снижение адаптивного потенциала клеток и организма в целом, что приводит к развитию патологических процессов [10–14]. Наиболее явная связь обнаруживается между геномной нестабильностью и канцерогенезом [15, 16]. Поэтому при оценке рисков острого или хронического мутагенного воздействия на здоровье населения в отдаленные сроки необходимо учитывать вклад индуцированной геномной нестабильности [17].

Детский организм из-за функциональной незрелости тканей и систем адаптации и защиты особенно чувствителен к влиянию сложного комплекса факторов окружающей среды. Поэтому связь заболеваемости с геномной нестабильностью выявлена, прежде всего, при обследовании детей, проживающих в экологически неблагополучных районах. Так, А.Е. Сипягина с соавторами [18] обнаружили физиологическую неполноценность потомства ликвидаторов последствий Чернобыльской катастрофы, которая выражалась в подавлении эндокринно-метаболического и иммунологического гомеокинеза, что сочеталось с изменением цитогенетических характеристик, белкового полиморфизма и репарационной активности ДНК у детей, рожденных от родителей-ликвидаторов, в сравнении с их сибсами, рожденными до аварии. Авторы заключают, что все указанные изменения могут служить основой для формирования хронических соматических заболеваний [18].

Национальная академия наук Беларуси

У детей, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях, установлены повышенная радиочувствительность геномов лимфоцитов к облучению *in vitro* и особенности динамики частот хромосомных аберраций и сестринских хроматидных обменов в 3-х клеточных генерациях [13]. В последние годы наряду с увеличением частоты цитогенетических нарушений отмечается рост общей соматической заболеваемости, нервно-психической дезадаптации, тенденция к хронизации болезней. Это позволило авторам постулировать биологическую значимость феномена пострадиационной геномной нестабильности и ее вклад в развитие соматической патологии [13].

Изучение различных проявлений геномной нестабильности у пострадавших от Чернобыльской катастрофы на территории Республики Беларусь также выявило взаимосвязь между формирующейся дестабилизацией генома и изменением ряда функционально-физиологических параметров [11]. Показано, что цитогенетические и молекулярно-генетические изменения у ликвидаторов регистрируются на фоне увеличения заболеваемости практически по всем нозологическим группам. Таким образом, теоретически и экспериментально обоснованное наличие радиационно-индуцированной геномной нестабильности и ее патогенетическая роль [6, 12, 14, 19] нашли свое отражение в результатах мониторинга последствий аварии на ЧАЭС у взрослого и детского населения [11, 13, 18].

Известно, что санитарно-эпидемиологическая ситуация в Республике Беларусь продолжает оставаться напряженной, хотя некоторая ее стабилизация произошла в результате выполнения ГНТП «Экологическая безопасность» (2001–2003) [20]. В экологически неблагоприятных регионах (на радиационно-загрязненных территориях, в городах с высокоразвитой химической промышленностью) отмечается повышение общей и онкологической заболеваемости населения. Популяционно-генетический мониторинг выявил тенденцию к увеличению частоты аберраций хромосом у лиц, профессионально контактирующих с химическими мутагенами [21]. Поэтому изучение феномена геномной нестабильности и его распространенности у населения нашей страны является актуальной научно-практической задачей, решение которой будет способствовать улучшению здравоохранения на основе проведения ранних профилактических мероприятий у лиц с выявленной геномной нестабильностью и предрасположенностью к болезням.

В данном сообщении представлены результаты исследования лимфоцитов периферической крови здоровых доноров с целью оценки фоновых уровней повреждений ДНК и реакции генома на модельный мутаген, характеризующих стабильное состояние генома у представителей белорусской популяции.

Материалы и методы

Образцы венозной крови получали от здоровых доноров-волонтеров разного возраста, не имеющих вредных привычек и контактов с мутагенами (обследовано 20 человек, составивших 1-ю контрольную группу). Кроме того, 10 образцов периферической крови получено из ГУ РНПЦ гематологии и трансфузиологии (2-я контрольная группа). При анкетировании доноров учитывались также такие показатели, как место работы, перенесенные вирусные инфекции, рентгенографическое обследование, длительный прием лекарственных препаратов.

Объект исследования — изолированные лимфоциты. Фракцию лимфоцитов выделяли из цельной крови центрифугированием в градиенте Histopaque-1077 (ICN) в течение 30 минут. Затем лимфоциты отмывали и инкубировали при 37°С в среде RPMI-1640 с добавлением инактивированной телячьей сыворотки (10 %) в течение 3-х часов. В качестве *модельного мутагена*, индуцирующего окислительные повреждения ДНК, использован пероксид водорода (H_2O_2) в концентрации 100 мкМ, которую получали разведением 3 % раствора H_2O_2 в PBS, (pH 7.4). Обработку клеток проводили при 4°С в течение 1 минуты, после чего клетки подвергались отмывке от мутагена охлажденным буферным раствором.

Выживаемость лимфоцитов определяли методом прижизненной окраски клеток трипановым синим. Анализ проводили под микроскопом с использованием камеры Бюркера, при этом учитывали соотношение мертвых (округлые

Национальная академия наук Беларуси

клетки без видимого повреждения мембраны, окрашенные в голубой цвет) и живых клеток.

Для выявления повреждений ДНК использовали метод щелочного гель-электрофореза единичных клеток (*Comet assay,* или метод ДНК-комет, щелочная версия) [22; 23], который включал следующие этапы: 1) приготовление слайдов, для чего клеточную суспензию (50 мкл), смешанную с низкоплавкой агарозой (100 мкл) наносили на охлажденное предметное стекло с заранее наслоенной 1 %-ой нормальной агарозой. Образец накрывали покровным стеклом и выдерживали на льду до отвердевания. 2) Лизис клеток, способствующий диссоциации клеточных мембран, проводили при температуре 4°С в темноте в лизирующем растворе, содержащем 2,5М NaCl, 0,1М EDTA, 10 мМ Tris-HCl, 1 % Triton X-100. 3) Щелочная денатурация при pH>13, переводящая щелоче-лабильные сайты ДНК в однонитевые разрывы, проходила в течение 20 минут в буфере для электрофореза при температуре 4°С в темноте. 4) Электрофорез, вызывающий миграцию фрагментов ДНК в электрическом поле с образованием «кометы», осуществлялся в горизонтальной камере в течение 20 минут в темноте при 4°С (1 V/см, 300 мА) в буфере, содержащем 300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA (pH>13). 5) Затем препараты подвергались нейтрализации с помощью 0,4 М Tris-HCl (pH 7,5) и высушивались в горизонтальном положении. 6) Окрашивание препаратов бромистым этидием (20 мкг/мл) производили непосредственно перед их визуальным анализом под флуоресцентным микроскопом. При этом, на стекле просчитывали 100 случайно встреченных клеток, а выявленные кометы относили к 5-ти классам (A_0–A_4). A_0 — хвоста как такового нет, — ореол вокруг ядра (halo) равномерный; A_1 — хвост меньше, либо равен 1/2 диаметра ядра, плотность ДНК в хвосте небольшая, до 5 %. A_2 — хвост приблизительно равен диаметру ядра, количество ДНК в хвосте около 25 %. A_3 — хвост больше диаметра ядра, количество ДНК в хвосте около 50 %. A_4 — ядро мелкое (но не дробленое, а четкое), почти вся ДНК в хвосте.

Среднее количество повреждений ДНК — **D** в условных единицах a.u. *(arbitrary units)* — рассчитывали по следующей формуле:

D (*a. u.*) = $A_1 + 2A_2 + 3A_3 + 4A_4$ [24].

Для *оценки скорости и эффективности репарации ДНК* проводили отбор проб на 0, 15, 30, 60, 120 и 180-й минуте после обработки лимфоцитов пероксидом водорода. Эффективность репарации ДНК (процент элиминированных повреждений ДНК) в каждой точке анализа вычисляли по разности между показателями уровня повреждений ДНК (a.u.), индуцированного сразу после мутагенного воздействия, т.е. на 0 минуте, и выявленного в последующие сроки анализа (через 15, 30, 60, 120 и180 минут) относительно 0-й точки. *Статистический анализ* полученных данных проводили с использованием стандартных средств Microsoft Office.

Результаты и обсуждение

Оценка фоновой частоты повреждений ДНК у здоровых доноров. С помощью метода ДНК комет оценена фоновая частота повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови здоровых доноров. Частота эндогенных повреждений определялась на 0-й и 180-й минутах от начала инкубации клеток. Анализ образцов крови из первой контрольной группы, насчитывающей 20 здоровых доноров, показал, что средний уровень повреждений ДНК равен 8,91±1,58 a.u. на 0-й и 9,63±0,83 a.u. на 180-й минуте. Анализ образцов крови, полученных из ГУ РНПЦ гематологии и трансфузиологии, показал, что уровень эндогенных повреждений, определяемый на 0 минуте, составляет 10,67±2,85, но в конце инкубации повышается до 20,38±2,91. Тем не менее, полученные данные не отличаются от фонового уровня повреждений ДНК, оцененных этим же методом в нашем предыдущем исследовании [25] и работах других авторов [26, 27].

Распределение индивидуальных частот ДНК-комет по *«длине хвоста»* (Рис.1-а) показывает, что для здоровых людей наиболее характерны повреждения ДНК, формирующие кометы с длиной хвоста от 5 до 15 a.u. Таким образом, определен фоновый уровень повреждений ДНК, типичный для здорового контингента, который на начальных этапах исследования в среднем не превышает 10 a.u.

Национальная академия наук Беларуси

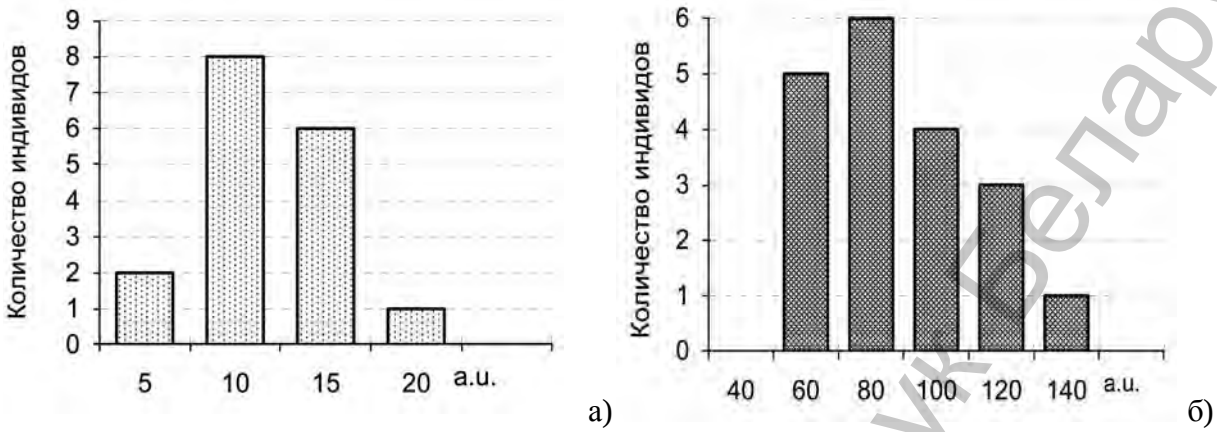


Рис. 1. Распределение индивидуальных частот эндогенных (а) и индуцированных (б) повреждений ДНК по «длине хвоста» наблюдаемых комет.

Оценка уровня химически индуцированных повреждений ДНК. С помощью этого же метода проанализирован уровень повреждений ДНК, индуцированный *in vitro* пероксидом водорода в дозе 100 мкМ. Проведена оценка цитотоксичности данной дозы мутагена с помощью стандартного метода окраски клеточной суспензии трипановым синим. Установлено, что средняя частота мертвых клеток после обработки H_2O_2 в указанной дозе колеблется от 2 % до 5,3 %, т.е. соответствует показателям, установленным ранее [25].

Оценка уровня индуцированных повреждений ДНК на 0-й минуте после мутагенной обработки лимфоцитов у представителей первой контрольной группы показала, что в среднем максимальное количество повреждений составляет 73,12±3,91 a.u. Анализ образцов крови из второй контрольной группы при тех же условиях эксперимента выявил более высокий уровень — 100,78±10,60. Однако, обе оценки находятся в пределах значений, характерных для действия мутагена в указанной дозе [24–26, 28, 29].

Индивидуальный уровень индуцированных повреждений ДНК у здоровых доноров колебался от 60 до 140 a.u., что видно из распределения комет по длине хвоста (Рис. 1-б). При этом, наиболее часто встречались повреждения ДНК, регистрируемые в виде комет с длиной хвоста от 60 до 100 a.u.

Таким образом, дана оценка восприимчивости генома здоровых доноров к ДНК-повреждающему эффекту пероксида водорода, которая в целом не отличается от известных данных литературы. Тем не менее, проведенные эксперименты на 30-ти образцах периферической крови свидетельствуют о неоднородности выборки обследованных доноров по реакции ДНК на действие модельного мутагена *in vitro*, что еще раз демонстрирует наличие индивидуальной чувствительности к мутагенным воздействиям, которая может влиять на результаты генетического мониторинга.

Оценка эффективности репарации ДНК у здоровых доноров. Репарация индуцированных повреждений ДНК изучалась на 15, 30, 60, 120 и 180-й минутах инкубации клеток после их мутагенной обработки. Данные о средних частотах окислительных повреждений ДНК у первой группы доноров представлены на рисунке 2-а. Показано, что за первые 15 минут их количество снижается в 2 раза, а к концу инкубации приближается к фону, что свидетельствует о полном завершении процесса репарации ДНК. Кинетика элиминации повреждений ДНК описывается степенным уравнением, при этом, репарация ДНК происходит с наибольшей скоростью в течение первых 30 минут после индукции окислительных повреждений, а весь цикл репарации занимает не более 3-х часов. Как видно из рисунка 2-б, несмотря на более высокий уровень индуцированных повреждений по сравнению с первой контрольной группой, во второй группе доноров наблюдались сходные закономерности репарации ДНК: за первые 15 минут элиминировалось 50 %, за 30 минут — более 60 % повреж-

Национальная академия наук Беларуси

дений. Следовательно, репарация поврежденной ДНК наиболее эффективна в течение первого получаса после окислительного стресса. Частота повреждений ДНК на 120 минуте несколько превышала фоновый уровень (различия на грани достоверности: t= 1,96, P= 0,07).

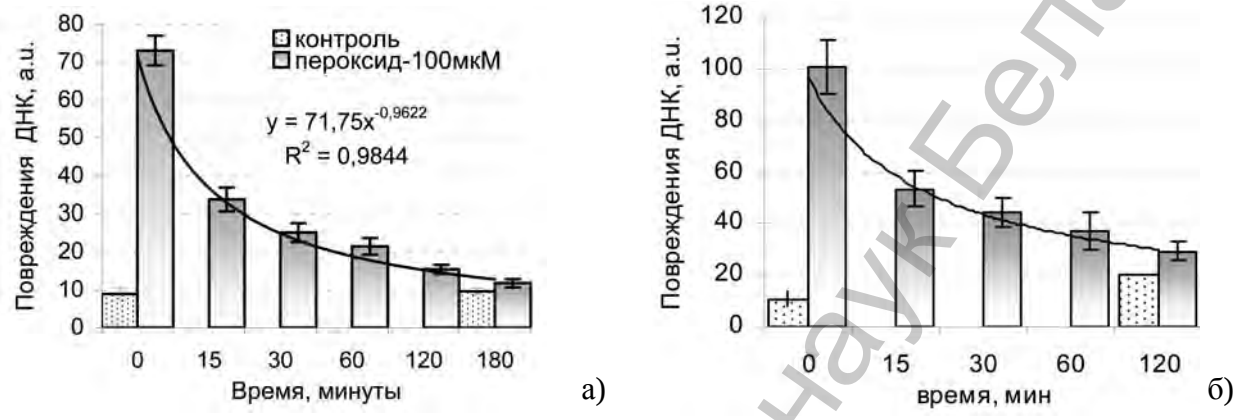


Рис. 2. Элиминация окислительных повреждений ДНК в зависимости от времени в первой (а) и второй (б) контрольных группах.

Распределение индивидуальных показателей эффективности репарации ДНК (рис. 3) показывает, что у большинства обследованных процессы репарации протекают наиболее активно в течение первых 15 минут, ликвидируя, как правило, от 50 % до 70 % окислительных повреждений ДНК. К концу инкубации (180-ая минута) количество повреждений в большинстве случаев уменьшается на 80–90 % по сравнению с первоначальным уровнем и приближается к фоновым значениям.

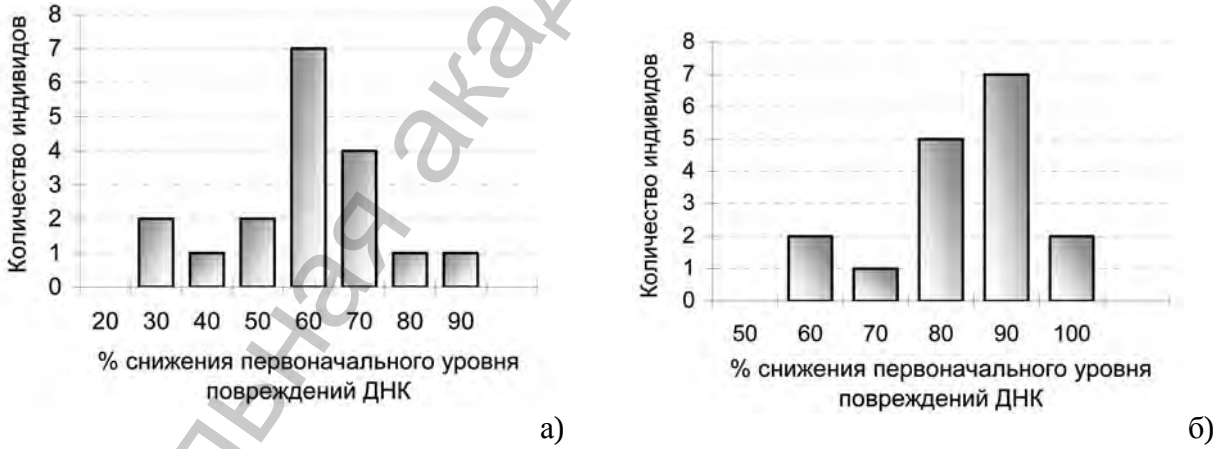


Рис. 3. Эффективность репарации ДНК через 15 минут (а) и 180 минут после мутагенного воздействия (б).

Таким образом, выявлены закономерности репарации ДНК после окислительного стресса, вызванного пероксидом водорода в двух группах здоровых доноров, которые свидетельствуют, что основная часть повреждений ДНК удаляется в течение первых 30 минут после мутагенного воздействия. Известно, что окислительные повреждения ДНК индуцируются активными формами кислорода (АКФ), которые образуются в ходе нормального метаболизма, при действии на организм прооксидантных агенов, а также при различных патологических состояниях (ревматоидном артрите, диабете, возрастных и онкологических заболеваниях) [27, 30–32]. Использованный тест ДНК-комет позволил установить фоновый уровень повреждений ДНК, значительная доля которых представлена окисли-

Национальная академия наук Беларуси

тельными повреждениями, а также оценить чувствительность генома к окислительному стрессу и репарацию ДНК в целом. Полученные показатели будут использованы в качестве базовых критериев для сравнения с аналогичными показателями у представителей групп риска, к числу которых можно отнести контингент лиц, профессионально или по месту проживания контактирующих с мутагенными загрязнителями, а также пациентов с предполагаемым диагнозом «синдром хромосомной нестабильности».

Заключение

Данные современной литературы указывают на существование связи между геномной нестабильностью и заболеваемостью населения, проживающего в экологически неблагоприятных условиях. Поэтому изучение этого феномена и его распространенности на территории Беларуси является актуальной научно-практической задачей, выполнение которой будет способствовать выявлению контингента лиц, предрасположенных к различным болезням. Для этой цели использован современный метод щелочного гель-электрофореза единичных клеток (метод ДНК-комет), позволяющий оценивать уровень эндогенных и экзогенных повреждений ДНК, чувствительность генома к дополнительному мутагенному воздействию и репарацию ДНК *in vitro*. В ходе исследования выявлена неоднородность выборки здоровых доноров по ответу их ДНК на пероксид водорода, что свидетельствует о наличии индивидуальной чувствительности к мутагенам. Полученные количественные оценки характеризуют стабильное состояние генома у представителей здорового населения Беларуси, по роду профессиональной деятельности не контактирующего с мутагенными факторами. Они будут использованы в качестве базовых критериев для выявления геномной нестабильности в группах риска.

Список использованных источников

1. Dose- and time-response relationships for lethal mutations and chromosomal instability induced by ionizing radiation in an immortalized human keratinocyte cell line / C. Mothersill [et al.] // Int. J. Radiat. Biol. — 2000. — Vol. 76, № 6. — P. 799—806.

2. Transgenerational mutation by radiation / Y.E. Dubrova [et al.] // Nature. — 2000. — Vol. 405. — P. 37.

3. Ryabokon, N.I. Transgenerational accumulation of radiation damage in small mammals chronically exposed to Chernobyl fallout / N.I. Ryabokon, R.I. Goncharova // Radiat. Environ. Biophys. — 2006. — Vol. 45, № 3. — P. 167—177.

4. Kirk, K.M. Induction of congenital malformations in the offspring of male mice treated with X-rays at pre-meiotic and post-meiotic stages / K.M. Kirk, M.F. Lyon // Mutat. Res. — 1984. — Vol. 125, № 1. — P. 75—85.

5. Vorobtsova, I.E. Irradiation of male rats increases the chromosomal sensitivity of progeny to genotoxic agents / I.E. Vorobtsova // Mutagenesis. — 2000. — Vol. 15, № 1. — P. 33—38.

6. Nomura, T. Transgenerational Effects of Radiation and Chemicals in Mice and Humans / T. Nomura // J. Radiat. Res. (Tokyo). — 2006. — Vol. 47, Suppl. B. — P. B83—B97.

7. Taylor, A.M. Chromosome instability syndromes / A.M. Taylor // Best Pract. Res. Clin. Haematol. — 2001. — Vol. 14, № 3. — P. 631—644.

8. Seemanovб, E. [Chromosome instability syndromes] / E. Seemanovб, P. Seeman, P. Jarolнm // Cas. Lek. Cesk. — 2002. — Vol. 141, № 1. — P. 16–22.

9. Tomaszewska, A. [Chromosome instability syndromes] / A. Tomaszewska, M. Srebniak, A. Gnyś // Pol. Merkur. Lekarski. — 2006. — Vol. 20, № 119. — P. 577—581.

10. Сусков, И.И. Проблемы геномной нестабильности в организме детей, проживающих в условиях действия малых доз радиации / И.И. Сусков, Н.С. Кузьмина // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2001. — Т. 41, № 5. — С. 606—614.

11. Мельнов, С.Б. Молекулярно-генетические и фенотипические эффекты антропогенных мутагенных воздействий у человека: автореф. дис. … док. биол. наук: 03.00.15 / С.Б. Мель-

Национальная академия наук Беларуси

нов; Ин-т генетики и цитологии. — Минск, 2004. — 45с.

12. Ингель, Ф.И. Качество жизни и индивидуальная чувствительность генома человека. Есть ли выход из порочного круга? / Ф.И. Ингель // Экологическая генетика. — 2005. — Т. 3, № 3. — С. 38—45.

13. Проблема индуцированной геномной нестабильности как основы повышенной заболеваемости у детей, подвергающихся низкоинтенсивному воздействию радиации в малых дозах / И.И. Сусков [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2006. — Т. 46, № 2. — С. 167—177.

14. Воробцова, И.Е. Трансгенерационная передача радиационно-индуцированной нестабильности генома / И.Е. Воробцова // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2006. — Т. 46, № 4. — С. 441—446.

15. Литтл, Д.Б. Немишенные эффекты ионизирующих излучений: выводы применительно к низкодозовым воздействиям / Д.Б. Литтл // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2007. — Т. 47, № 3. — С. 262—272.

16. Копнин, Б.П. Нестабильность генома и онкогенез / Б.П. Копнин // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 41, № 2. — С. 369—380.

17. Bridges, B.A. Radiation and germline mutation at repeat sequences: are we in the middle of a paradigm shift? / B.A. Bridges // Radiat. Res. — 2001. — Vol. 156, № 5. — P. 631—641.

18. Организация медицинской помощи детям различных когорт наблюдения, подвергшимся воздействию малых доз радиации / А.Е. Сипягина [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2006. — Т. 46, № 3. — С. 374—380.

19. Dubrova, Y.E. Radiation induced transgenerational instability / Y.E. Dubrova // Oncogene. — 2003. — Vol. 22, № 45. — P. 7087—7093.

20. Соколов, С.М. Вклад гигиенической науки в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения Республики Беларусь / С.М. Соколов, И.А. Застенская, В.Ю. Зиновкина // Здоровье и окружающая среда. — 2004. — № 4. — С. 3—10.

21. Популяционно-генетическая оценка среды обитания населения Беларуси: Анализ цитогенетической нестабильности в различных контингентах / А.Д. Политыко [и др.] // Сб. науч. тр. / Минск, 2004. —Вып. 9: Достижения медицинской науки Беларуси. — С. 24—25.

22. Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing / R.R. Tice [et al.] // Environ. Mol. Mutagen. — 2000. — Vol. 35. — P. 206—221.

23. Collins, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations / A.R. Collins // Mol. Biothechnology. — 2004. — Vol. 26. — P. 249—261.

24. Collins, A.R. *In vitro* repair of oxidative and ultra-violet-induced DNA damage in supercoiled nucleoid DNA by human cell extract / A.R. Collins, I.M. Fleming, C.M. Gedik // Biochem. Biophys. Acta. — 1994. — Vol. 1219, № 3. — P. 724—727.

25. Гено- и цитотоксичность перекиси водорода в лимфоцитах периферической крови человека *in vitro* / О.В. Даливеля [и др.] // Вес. Нац. акад. Навук Беларусі. Сер. біял. навук. — 2008. — № 2. — С. 49—52.

26. A 1,4-dihydropyridine derivative reduces DNA damage and stimulates DNA repair in human cells *in vitro* / N.I. Ryabokon [et al.] // Mutat. Res. — 2005. — Vol. 587, № 1-2. — P. 52—58.

27. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis / O. Altindag [et al.] // Clin. Biochem. — 2007. — Vol. 40, № 3-4. — P. 167—171.

28. The effect of vatious antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay / D. Anderson [et al.] // Mutat. Res. — 1994. —Vol. 307. — P. 261—271.

29. The comet assay a biomonitoring tool for nutraceutical research / V.W.C. Wong [et al.] // Cur. Topics in Nutraceutical. Res. — 2005. Vol. 3. — P. 1–14.

30. Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells / B.L. Pool-Zobel [et al.] // Carcinogenesis. — 2000. — Vol. 21, № 6. — P. 1247—1252.

31. Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients / L. Migliore [et al.] // Neurobiol. Aging. — 2005.– Vol. 26, № 5. — P. 567—573.

32. Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leukocytes / V. Pitozzi [et al.] // Mutat. Res. — 2003.– Vol. 529, № 1-2. — P. 129—133.

Дата поступления статьи 4 апреля 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 616.831-056.7-02:616.89-008.441.42

О.А. Скугаревский, Н.Г. Даниленко

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА НЕЙРОТРОПНОГО ФАКТОРА МОЗГА (BDNF) ПРИ НАРУШЕНИЯХ ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»
Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Нарушения пищевого поведения (НПП) (нервная анорексия (НА), нервная булимия (НБ) характеризуются целенаправленным отклоняющимся от нормативного поведением, ориентированным на коррекцию внешности. При этом вмешательство в механизмы поддержания энергетического гомеостаза осуществляется посредством экстремальных методов контроля формы и/или массы тела (ограничения в питании вплоть до полного отказа от еды, самовызывание рвоты, злоупотребление мочегонными и слабительными препаратами, изнуряющие физические нагрузки и пр.). Изучение причин НПП свидетельствует о вовлеченности психологических, средовых и биологических, в т.ч. генетических факторов. Наследуемость подверженности НПП, по результатам близнецовых исследований, составляет от 54 % до 80 % [1].

Семейные, близнецовые и молекулярно-генетические исследования позволили выявить отдельные гены и локусы хромосом, участвующие в регуляции пищевого поведения и массы тела. Описаны генетические маркеры подверженности ограничительным стереотипам питания, «растормаживания аппетита», переедания и очистительного поведения (самовызывание рвоты), признаки нарушения контроля импульсивности, патогномоничные особенности личностных характеристик и черт темперамента (обсессивность, перфекционизм, склонность к избеганию нового и пр.) [2-4].

Несмотря на то, что не обнаружено генов со значимым изолированным влиянием на развитие НА и НБ, есть основания полагать, что нарушения в системе нейротропинов (в т.ч. BDNF-белка), с учетом их нисходящих влияний на механизмы контроля аппетита, могут предрасполагать к этим расстройствам [5, 6]. Взаимосвязь между BDNF и НПП подтверждается ключевой ролью этого нейротропина в опосредовании нейронального ответа на такие внешние средовые факторы, как диетические ограничения и физические упражнения [7, 8], а также его участием в формировании обсессивно-компульсивных расстройств и личностных особенностях, ассоциированных с депрессией [9, 10].

Полиморфизм двух участков BDNF гена (-270C/T и Val66Met) выявлен как сопряженный с нарушениями пищевого поведения. В частности, наличие метионинового аллеля в популяциях различных стран было связано с низким ИМТ, ограничительным подтипом НА (а, впоследствии, и со всеми остальными фенотипами НПП), предпочтительным наследованием гаплотипа -270C/Met66 больными НА(Огр.Т), большей частотой и тяжестью проявлений компульсивного переедания [11-13].

Целью настоящего исследования было изучить сопряженный характер генетического полиморфизма по -270C/T и Val66Met фрагментам BDNF-гена в их взаимосвязи с клинико-психологическими характеристиками нарушений пищевого поведения (нервная анорексия и нервная булимия).

Национальная академия наук Беларуси

Материалы и методы

Индекс массы тела (ИМТ) был использован в качестве маркера антропометрических параметров (ИМТ=масса тела (кг)/рост($м^2$)). Для оценки степени выраженности девиантного пищевого поведения использовался Опросник пищевых предпочтений (ОПП-26) и клиническая шкала оценки нарушений пищевого поведения (The Yale-Brown-Cornell Eating Disorder Scale, YBC-EDS). Выраженность искажения когнитивно-оценочного компонента образа собственного тела (ОСТ) определялась на основании Опросника образа собственного тела (ООСТ). Качество жизни, связанное со здоровьем у больных НПП оценивалось на основании методики SF-36. Оценка полиморфизма Val66Met и -270C/T производилась методом ПЦР-ПДРФ анализа. Статистический анализ был реализован на основании пакета прикладных программ Statistica 6.0.

Экспериментальная часть

В сравнительном исследовании участвовало 59 пациентов, страдающих НПП (НА, n=40 (ограничительный тип (НА (Огр.Т)), n=24, с эпизодами перееданий/ компенсаторного поведения (НА (П/ОП)), n=16); НБ, n=19) и 46 человек контрольной группы. Основная и контрольная группы были сопоставимы по возрасту (средний возраст основной группы составил 21,6±5,71 лет, контрольной — 21,6±1,19 лет ($p>0,05$)). Все участники исследования были женского пола и постоянно проживали на территории Республики Беларусь, по национальности были белорусами или русскими, как и их родственники 1 линии родства.

Для исключения вероятности систематической ошибки, связанной с подбором исследуемых групп (и уменьшения вероятности наличия доклинических проявлений НПП в контрольной группе), претендентам на участие в проекте в составе контрольной группы было предложено выполнить ряд тестов на удовлетворение критериям включения в исследование. Эти тесты касались оценки антропометрических показателей с определением индекса массы тела (ИМТ); критерий включения: 18,5≤ИМТ≤25), суммарного балла по Опроснику пищевых предпочтений (ОПП-26, критерий включения: ≤9 баллов); самооценки веса как «Нормальный» (иные оценки «Избыточный», «Недостаточный»); описательных характеристик мотивации поведения по контролю массы тела на момент обследования (критерии включения: «Пытаюсь остаться в прежнем весе» или «Не пытаюсь что-либо делать вообще»; иные оценки: «Пытаюсь снизить вес», «Пытаюсь набрать вес»). У респонденток колебания массы тела за предшествовавшие исследованию 3 года не должны были превышать 5 кг. Одновременно всем пунктам критериев включения для контрольной группы удовлетворили 46 человек, которые и составили контрольную группу.

Результаты и обсуждение

Основная и контрольная группа достоверно различалась по средней величине ИМТ (16,44 (σ=3,58) и 20,77 (σ=1,79), $p<0,0001$) и суммарному баллу опросника ОПП-26 (25,89 (σ=14,95) и 2,21 (σ=2,05), $p<0,0001$) соответственно.

Распределение частоты генотипов и аллелей для -270C>T и Val66Met соответственно приведены в таблицах 1 и 2.

Национальная академия наук Беларуси

Таблица 1

Распределение генотипов -270C>T и Val66Met у больных НПП и в контрольной группе

Группы обследованных	Распределение генотипов (n, %)				
	CC	CT	TT	Val/Val	Val/Met
Больные НПП	53 (90)	6 (10)	0	49 (83,1)	10 (16,9)
НА в целом	36 (90)	4 (10)	0	33 (82,5)	7 (17,5)
НА(Огр.Т)	23 (95,8)	1 (4,2)	0	21 (87,5)	3 (12,5)
НА(П/ОП)	13 (81,2)	3 (18,8)	0	12 (75,0)	4 (25,0)
НБ в целом	17 (89,5)	2 (10,5)	0	16 (84,2)	3 (15,8)
Неочистительные формы НПП	23 (95,8)	1 (4,2)	0	21 (87,5)	3 (12,5)
Очистительные формы НПП	30 (85,7)	5 (14,3)	0	28 (80,0)	7 (20,0)
Контроль	42 (91,3)	3 (6,5)	1 (2,2)	36 (76,6)	11 (23,4)

Распределение указанных генотипов в контрольной группе было сопоставимо с таковым по странам Европы (n=403:CC (p>0,05), CT (p>0,05), TT (p=0,044), Val/Val (p>0,05), Val/Met (p>0,05) [14].

Таблица 2

Распределение аллелей -270C>T и Val66Met у больных НПП и в контрольной группе

Группы обследованных	Распределение аллелей (n, %)					
	C	T	p, ОШ (95 ДИ)	Val	Met	p, ОШ (95 ДИ)
Больные НПП	112 (94,92)	6 (5,08)	>0,05, 0,93 (0,28-3,16)	108 (91,53)	10 (8,47)	>0,05, 0,77 (0,31-1,90)
НА в целом	76 (95,0)	4 (5,0)	>0,05, 0,92 (0,24-3,53)	73 (91,25)	7 (8,75)	>0,05, 0,80 (0,29-2,18)
НА(Огр.Т)	47 (97,92)	1 (2,08)	>0,05, 0,37 (0,04-3,26)	45 (93,75)	3 (6,25)	>0,05, 0,50 (0,13-1,90)
НА(П/ОП)	29 (90,62)	3 (9,38)	>0,05, 2,01 (0,45-8,97)	28 (87,5)	4 (12,5)	>0,05, 1,08 (0,32-3,66)
Группы обследованных	**Распределение аллелей (n, %)**					
	C	T	p, ОШ (95 ДИ)	Val	Met	p, ОШ (95 ДИ)
НБ в целом	36 (94,74)	2 (5,26)	>0,05, 0,97 (0,18-5,21)	35 (92,11)	3 (7,89)	0,65 (0,17-2,46)
Неочистительные формы НПП	47 (97,92)	1 (2,08)	>0,05, 0,37 (0,04-3,26)	45 (93,75)	3 (6,25)	>0,05, 0,50 (0,13-1,90)
Очистительные формы НПП	65 (92,86)	5 (7,14)	>0,05, 1,34 (0,37-4,82)	63 (90,0)	7 (10,0)	>0,05, 0,84 (0,31-2,29)
Контроль	87 (94,56)	5 (5,43)		83 (88,30)	11 (11,70)	

Национальная академия наук Беларуси

Частоты аллелей у больных НА и НБ между подгруппами больных в целом достоверно не различалась. Если частота аллелей С и Т промоторного участка гена BDNF (-270C>T) больных НА и НБ была сопоставима с таковой в обследованной нами контрольной группе и практически идентична таковой для общей группы больных НБ (95,1 % и 4,9 % соответственно) и объединенного контроля стран Европы (95,2 % и 4,8 %), то плотность аллелей Val66 и Met66 несколько различалась. Для нашей выборки было характерно уменьшение частоты метионинового аллеля по сравнению с данными европейских стран, что было характерно также для германской популяции. В то же время это соотношение имело обратную направленность при сопоставлении с выборками Италии, Франции, Испании, Британии, где, относительно группы контроля, чаще встречался аллель Met66 [13].

Анализ полученных нами данных с учетом клинических подтипов НПП выявил увеличение частоты метионинового аллеля и генотипа Val66Met в континууме (1) от ограничительной формы НА до подтипа с эпизодами перееданий и/или компенсаторного поведения и (2) от неочистительных подтипов НПП к очистительным формам расстройств. Указанные относительные различия были свойственны также больным НА во Франции и Британии. Несмотря на отсутствие в нашем исследовании достоверных различий (в частности, в связи с малой плотностью метионинового аллелля в целом по выборке), наши данные созвучны работам других авторов, где показано, что гаплотип -270C-Met66 отмечен как значимо связанный с фенотипическими проявлениями как НА, так и НБ.

Различия по сопоставляемым частотным характеристикам генотипов и аллелей для Val66Met и -270C>T между нашей выборкой и данными других Европейских стран едва ли могут быть объяснены различиями в диагностических оценках или популяционно-специфическими феноменами НПП. Это подтверждается сопоставимостью данных наших клинических исследований с таковыми в странах Европы, а также унифицированным подходом к диагностическим градациям и общностью используемых психометрических инструментов. По-видимому, выявленное нами своеобразие (меньшая плотность метионинового аллеля наряду с сопоставимой частотой полиморфизма -270C>T в контрольной группе по сравнению со странами Европы) является специфичным для нашей популяции.

Принимая во внимание сопоставимость частоты исследованных генотипов и аллелей между больными НПП и здоровыми, а также выраженную распространенность проявлений отклоняющегося пищевого поведения в популяции, мы исследовали сопряженность полиморфизма Val66Met и -270C>T, факта наличия НПП и степени выраженности девиантного пищевого поведения с учетом порогового балла ОПП-26. Анализ таблицы сопряженности (2*2*2) показал, что только при наличии НПП интенсивность проявлений отклоняющегося пищевого поведения сопряжены с полиморфизмом Val66Met (2-сторонний точный критерий Фишера: p=0,00038) и лишь на уровне тенденции — с полиморфизмом -270C>T (χ^2=4,73, p=0,030, 2-сторонний точный критерий Фишера: p>0,05).

Полиморфизм G196A (Val66Met)* и -270C/T *и дезадаптивное пищевое поведение. Ранее было показано, что для носителей полиморфного аллеля -270T в популяции европейских стран свойственны более низкие максимальные значения ИМТ и более раннее начало снижения массы тела при НБ [14]. В наших наблюдениях носители мутантного **-270T аллеля характеризовались более низким ИМТ накануне начала расстройства** как в целом по всей группе больных (18,06 кг/м^2 против 20,99 кг/м^2, p=0,035), так и особенно в случаях очистительных подтипов НПП (17,73 кг/м^2 против 21,90 кг/м^2, p=0,018). Такое же соотношение наблюдалось и в отношении ИМТ на момент первичного обследования, но не достигало уровня статистической значимости. Среди больных НА все наблюдения с полиморфным аллелем -270T приходились на клинические случаи со значительной потерей массы тела (ИМТ менее 17,5 кг/м^2). С другой стороны, взаимосвязь выраженного дефицита массы тела и плохого прогноза подтверждена многочисленными исследованиями, причем генетические факторы могут быть причиной дезадаптивного характера регуляции массы тела.

Мы подвергли анализу различия в фенотипических проявлениях НПП (специфическая симптоматика НПП (YBC-EDS), сопутствующая психопатологическая симптоматика (SCL-

Национальная академия наук Беларуси

90-R), качество жизни, связанное со здоровьем (SF-36)) с учетом полиморфизма Val66Met. Значимые различия, выявленные у больных НА представлены в таблице 3.

Таблица 3

Значимые различия выраженности специфческой симптоматики НПП (YBC-EDS), сопутствующей психопатологической симптоматики (SCL-90-R) и характеристик качества жизни (SF-36)) с учетом полиморфизма Val66Met у больных нервной анорексией, M (σ)

Параметры оценки		Val66Val	Val66Met	U тест Манна-Уитни, p, Спирмена R
Больные НА в целом				
YBC-EDS (Ритуалы) (n=23)		8,43 (3,89)	13,0 (1,41)	=0,047; R= +0,42, p=0,044
SCL-90-R, n=34	Соматизация	0,87 (0,61)	1,77 (1,01)	=0,016; R= +0,41, p=0,016
	Обсессивно-компульсивные переживания	0,97 (0,57)	1,92 (0,91)	=0,029; R= +0,38, p=0,028
	Депрессия	1,14 (0,63)	2,04 (0,79)	=0,029; R= +0,38, p=0,044
	Фобическая тревожность	0,26 (0,32)	0,92 (0,89)	=0,028; R= +0,36, p=0,036
	Дополнительные симптомы (Add)	0,92 (0,58)	1,86 (1,04)	=0,033; R= +0,37, p=0,031
SF-36, n=35	Социальное функционирование	53,88 (25,47)	25,00 (15,31)	=0,012; R= -0,43, p=0,011
	Качество жизни, обусловленное соматическим дискомфортом (боль)	71,75 (23,37)	39,00 (28,86)	=0,033; R= -0,36, p=0,032
	Общее состояние здоровья	51,50 (15,92)	26,00 (11,94)	=0,002; R= -0,50, p=0,002
	Физический компонент здоровья	70,00 (12,32)	52,29 (20,67)	=0,048; R= -0,34, p=0,046
Больные НА(П/ОП)				
YBC-EDS (Ритуалы), n=11		9,44 (2,30)	13,00 (1,41)	=0,036; R= +0,66, p=0,028
YBC-EDS (Мотивация к изменениям), n= 11		6,11 (4,04)	17,0 (5,66)	=0,036; R= +0,67, p=0,023
SF-36 (Общее состояние здоровья), n=13		46,50 (11,80)	23,33 (5,77)	=0,007; R= -0,74, p=0,004

Национальная академия наук Беларуси

Анализ таблицы 3 свидетельствует о том, что при наличии полиморфизма Val66Met у больных НА с мутантным метиониновым аллелем наблюдается большая тяжесть ритуалов в структуре дезадаптивного пищевого поведения, меньшая мотивация к изменениям, большая тяжесть сопутствующей психопатологической симптоматики. Наиболее значимые изменения касаются большей степени выраженности соматизации, депрессивных переживаний, феноменов обсессивно-компульсивного регистра и тревожных проявлений, которые актуализируются в ответ на ограничения в питании и способствуют закреплению болезненной симптоматики НПП. Включение в уравнение логистической регрессии (зависимая переменная — «случай» / «не случай» полиморфизма Val66Met у больных НА) в качестве переменных-предикторов всех кластеров психопатологической симптоматики (SCL-90-R) выявило значимое влияние единственного **фактора обсессивно-компульсивных переживаний** (R^2 Нейджелкерка =0,37), χ^2=8,06, p=0,005. Выделенные нами феномены (соматизация, тревожные и депрессивные переживания, феномены обсессивно-компульсивного регистра) в их нейробиологической основе имеют тесную связь с нарушениями нейромедиаторного контроля тревоги и импульсивности. Дефицит нейротропного фактора, связанный с экспрессией BDNF-гена, может сопутствовать поломке механизмов серотонинэргической нейротрансмиссии, ответственной за реализацию процессов соматизации.

Нами выявлена достоверная связь между полиморфизмом **Val66Met и выраженностью субъективной булимической симптоматики** как по числу дней (2-сторонний p=0,018, Спирмена R=0,40, p=0,010), так и эпизодов (2-сторонний p= 0,011; Спирмена R=0,42, p=0,007) с большей выраженностью проявлений у носителей Met66 в целом по всей основной группе обследованных. Выявленная сопряженность между полиморфизмом Val66-Met и субъективными булимическими проявлениями становится еще более отчетливой в наблюдениях с очистительными фенотипом НПП (Спирмена R (дни)=0,49, p=0,016, Спирмена R (эпизоды)=0,54, p=0,008). Клиническая значимость булимической симптоматики состоит в том, что, оценивая процесс приема пищи как «бесконтрольный» и находясь под давлением опасения полноты, пациенты в результате прибегают к экстремальным методам контроля массы тела (самовызывание рвоты, прием слабительных и мочегонных средств и пр.).

Сочетанный анализ искажений ОСТ при нарушениях пищевого поведения и полиморфизма по Val66Met показал, что **искажения когнитивно-оценочного компонента ОСТ** в целом по группе больных достоверно сопряжены с наличием метионинового аллеля (τ Кендалла = 0,27, p= 0,005). Наличие полиморфизма Val66Met повышает риск искаженного ОСТ при НПП практически в 2 раза (отношение шансов = 1,84 (95 %ДИ: 1,19-2,86).

Заключение

Полиморфизм -270C>T оказывает свой эффект на предболезненном уровне, предопределяя более низкие значения среднего ИМТ. Одним из механизмов закрепления девиантного пищевого поведения, опосредованноговзаимодействием средовых и генетических влияний, является актуализация психопатологической симптоматики обсессивно-компульсивного регистра на фоне ограничительных тенденций в питании, чему сопутствует полиморфизм Val66Met гена нейротропного фактора мозга. Обусловленное этим изменение экспрессии BDNF-гена выявило достоверно большую тяжесть феноменов соматизации, обсессивно-компульсивных (в т.ч. ритуализированные действия) и депрессивных переживаний и было сопряжено с большей выраженностью булимической симптоматики, наличием искажения образа собственного тела и меньшей мотивацией к изменениям (излечению) при нарушениях пищевого поведения. Большая тяжесть указанных клинических проявлений, по-видимому, вторично предопределяет худшие показатели качества жизни, связанного со здоровьем у больных нервной анорексией при наличии полиморфного метионинового аллеля гена нейротропного фактора мозга.

Национальная академия наук Беларуси

Список использованных источников

1. Fairburn, C.G. Eating disorders / C.G. Fairburn, P.J. Harrison // Lancet. — 2003. — Vol. 361. — P. 407—416.

2. Significant linkage on chromosome 10p in families with bulimia nervosa / C.M. Bulik [et al.] // Am. J. Hum. Genet. — 2003.— Vol. 72. — P. 200—207.

3. Evidence for susceptibility gene for anorexia nervosa on chromosome 1 / D.E. Grice [et al.] // Am. J. Hum. Genet.— 2002. — Vol. 70. — P. 787—792.

4. Klump, K.L. Genetic relationships between personality and eating attitudes and behaviors\ K.L. Klump, M. McGue, W.G. Iacono // J. Abnorm. Psychol. — 2002. — Vol. 111 (2). — P. 380—389.

5. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotoninergic abnormalities / W.E. Lyons [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1999. — Vol. 96. — P. 15239—15224.

6. Pelleymounter, M.A. Characteristics of BDNF-induced weight loss / M.A. Pelleymounter, M.J. Cullen, C.L. Wellman // ExP. Neurol. — 1995. — Vol. 131. — P. 229—238.

7. Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in dentate gyrus of rats /J. Lee [et al.] // J. Mol. Neurosci. — 2000. — Vol. 15. — P. 99—108.

8. Exercise and brain neurotrophins / S.A. Neeper [et al.] // Nature. — 1995 — Vol. 373. — P. 109.

9. A BDNF coding variant is associated with the NEO personality inventory domain neuroticism, a risk factor for depression / S. Sen [et al.] // Neuropsychopharmacol. — 2003. — Vol. 28. — P. 397-401.

10. Sequence variance of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene are strongly associated with obsessive-compulsive disorder / D. Hall [et al.] // Am. J. Hum. Genet. — 2003. — Vol. 73. — P. 370 — 376.

11. Met66 in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) precursor is associated with anorexia nervosa restrictive type / M. Ribases [et al.] / Mol Psychiatr.— 2003. — Vol. 8. — P. 745 — 751.

12. The 196G/A (val66met) polymorphism of the BDNF gene is significantly associated with binge eating behavior in women with bulimia nervosa or binge eating disorder / P. Monteleone [et al.] / Neurocsi Lett. — 2006. — Vol. 406. — P. 133 — 137.

13. Association of BDNF with restricting anorexia nervosa and minimum body mass index: a family-based association study of eight European populations / M. Ribases [et al.] // European Journal of Human Genetics. — 2005. — Vol. 13. — P. 428 — 434.

14. Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss on six European populations / M. Ribases [et al.] / Human Molecular Genetics. — 2004. — Vol. 13, №12. — P. 1205 — 1212.

Дата поступления статьи 24 марта 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 616.24-006-07:577.21+575.1/.2´316

Е.П. Михаленко, Н.Н.Чакова, С.Н Полонецкая, Н.В.Чеботарева, С.Е. Дромашко, Э.В. Крупнова

ПОЛИМОРФИЗМ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

После успешного завершения в начале XXI века Международной программы «Геном человека» все большее внимание ученых привлекает проблема разнообразия генома человека, т.е. генетического полиморфизма и его связь с мультифакторными патологиями (сердечно-сосудистые заболевания, остеопороз, астма, спорадический рак, различные виды рака легкого). Причиной возникновения этих заболеваний служит воздействие на организм неблагоприятных факторов среды. Однако вероятность развития перечисленной патологии определяется генетически детерминированной чувствительностью организма к данному воздействию. В первую очередь индивидуальная чувствительность организма обусловлена генетическим полиморфизмом ферментов детоксикации. Хорошо известно, что существуют значительные межпопуляционные различия в распределении частот полиморфных аллелей генов, которые зависят от географических условий, расовой (этнической) принадлежности и др. и возникают в результате естественного отбора. В соответствии с этим представляется целесообразным изучение ассоциации полиморфных вариантов генов с мультифакториальной патологией в конкретном регионе.

Исходя из вышеизложенного, нами проводится изучение полиморфизма GST- генов, а также других генов биотрансформации ксенобиотиков, в частности NAT2 и CYP1A1, в белорусской популяции.

Материалы и методы

Обследовано 180 человек с различной мультифакториальной патологией, проживающих в г. Минске. При формировании группы был использован метод направленного подбора с учетом возраста, пола, статуса курения, профессиональной принадлежности. Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили стандартным способом с использованием фенольно-хлороформной экстракции.Частоты полиморфных аллелей генов GSTM1 и GSTT1 определяли с помощью метода полимеразной цепной реакции [1]. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1,8 % агарозном геле. Гомозиготную делецию отличали от гетерозиготы и нормальной гомозиготы по отсутствию соответствующей полосы на электрофореграмме.

Результаты и обсуждение

Вариабельность генома человека по современным оценкам, составляет от 2 до 10 млн. пар оснований, часть из которых и определяет индивидуальные особенности ответа на воздействие окружающей среды (ксенобиотиков). Воздействие ксенобиотиков на организм реализуется через реакции, осуществляемые специфическими ферментативными системами клеток. Фермен-

Национальная академия наук Беларуси

там этих систем присущ ряд важных свойств: перекрывающаяся субстратная специфичность, индуцибельность и генетический полиморфизм (наличие наследуемых аллельных вариантов генов). Первое означает, что во многих случаях метаболизм одного ксенобиотика осуществляется несколькими ферментами, среди которых преимущество имеет тот, который в данных условиях ведет метаболизм с более высокой скоростью. Генетический полиморфизм ферментов биотрансформации (существование наследуемых аллельных вариантов генов) приводит к различиям в активности от нескольких раз до десятков и сотен раз. Перечисленные свойства ферментов биотрансформации ксенобиотиков (ФБК) лежат в основе широкой межиндивидуальной вариабельности метаболизма чужеродных соединений [2], что предполагает их различную активность в метаболизме субстратов и обуславливает индивидуальную чувствительность, как к химическим соединениям, так и к эндогенным веществам [3]. Процесс биотрансформации, включающий ферментативное превращение чужеродных включений или ксенобиотиков, обычно подразделяется на три фазы [4].

После попадания в наш организм интактные экзогенные молекулы вначале активируются в ходе реакции фазы I, главным образом — посредством монооксигенации (составляет до 90 % всех реакций фазы I) с участием цитохромов (CYP450). Ген CYP1A1 является одним из основных в семействе цитохромов P450 и участвует в метаболической активации многих ксенобиотиков, и известен как ген, который активизируется под действием дыма сигарет. Он кодирует фермент цитохром CYP1A1, метаболизирующий полициклические ароматические углеводороды [5,6]. Легко индуцируемая, генетически детерминированная форма этого фермента связана с повышенным риском рака легких у курильщиков. Активация экзогенных веществ в процессе фазы I приводит к образованию промежуточных токсических продуктов, которые детоксифицируются в ходе реакций фазы II. Ключевыми ферментами второй фазы детоксикации являются глутатионтрансферазы класса μ (GSTM1) и класса θ (GSTT1) и ариламин N-ацетилтрансфераза NAT2 [4-6]. GSTM1 и GSTT1 катализируют реакцию конъюгации восстановленного глутатиона (GSH) с множеством электрофильных субстратов, играют важную роль в защите клетки от продуктов перекисного окисления, а также участвуют в метаболизме простагландинов, лейкотриенов, транспорте стероидных гормонов. Наличие гомозиготной делеции (нулевой генотип) этих генов характеризуется отсутствием кодируемого фермента и является маркером чувствительности обследуемого к лекарственным препаратам, к неблагоприятному воздействию окружающей среды и, определяет, тем самым, его предрасположенность к мультифакториальной патологии.

NAT2 — фермент участвующий в биотрансформации преимущественно ароматических и гетероциклических аминов и гидразинов. Известен метаболический полиморфизм ацетилирования, который проявляется наличием в популяции фенотипов «быстрых» и «медленных» ацетиляторов. В его основе лежат точковые мутации, которых к настоящему времени известно 13 в кодирующей области NAT2, в различных комбинациях образующих 36 аллелей [7]. Особенностью полиморфизма N-ацетилтрансферазы 2 являются выраженные этнические различия. Среди популяций Европы и Северной Америки от 40 до 70 % являются «медленными» ацетиляторами, тогда как среди популяций тихоокеанского побережья Азии (японцы, китайцы, корейцы) «медленными» ацетиляторами являются только от 10 до 30 % представителей [8]. Генетический полиморфизм NAT2 у европеоидов России, Беларуси остается малоизученным. N-ацетилтрансферазе 2 придают важное значение в формировании приобретенной подверженности к экологическим обусловленным заболеваниям, что делает актуальными исследования этого гена.

Вся система функционирует до тех пор, пока процессы фазы I и фазы II уравновешены. Однако, если реакции фазы I слишком активны, или детоксификация в фазе II недостаточна, то может образоваться избыточное количество промежуточных токсических продуктов (эндогенных свободных радикалов). Избыток промежуточных токсических молекул, таким образом, вызывает токсичность на клеточном и тканевом уровнях и может подвергать человека риску заболеваний, связанных с воздействием окружающей среды (большинство случаев онкологических заболеваний легких, предстательной железы, толстой кишки и т.п.), а также побочных реакций на медикаменты. Некоторые авторы выделяют также

Национальная академия наук Беларуси

реакции фазы III — «элиминации» — со значительной долей участия в процессе генов выведения, например гена MDR — гена различных видов резистентности по отношению к лекарственным препаратам.

Многочисленные исследования показали, что этот ген играет важнейшую роль в развитии устойчивости к препаратам для лечения раковых заболеваний.

Наши исследования полиморфизма GST-генов показали (Табл.1), что частота встречаемости нуль-аллелей GSTT1 и GSTM1 у жителей Беларуси соответствует частоте встречаемости этого генотипа у европейцев.

Таблица 1

Частота распределение «нулевых» генотипов GST-генов у европеоидов

	Частота нуль-генотипа GSTM1,(%)	**Частота нуль-генотипа GSTT1,(%)**	**Источник**
Россия	42,2	4-6	[5]
Западная Европа	40-50	10-20	[9]
Беларусь	41,7	12,6	Собственные исследования

Принимая во внимание данные литературы об ассоциации полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с возникновением различных мультифакториальных заболеваний, представлялось целесообразным провести анализ полиморфизма GST-генов с учетом сопутствующих заболеваний (Табл. 2).

С этой целью были выделены группы индивидов, страдающих заболеваниями: сердечно-сосудистой системы (ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия, атеросклероз); органов дыхания (хроническая пневмония, абсцесс); желудочно-кишечного тракта (язвенная болезнь, хронический гастрит, панкреатит); рак легкого.

Таблица 2

Частоты комбинаций генотипов генов GSTM1 и GSTT1 с учетом сопутствующих заболеваний

Группы	**GSTM1(-)/ GSTT1(+) (%)**	**GSTM1(+)/ GSTT1(-) (%)**	**GSTM1(+)/ GSTT1(+) (%)**	**GSTM1(-)/ GSTT1(-) (%)**
Сердечно-сосудистые заболевания	34,4	8,5	54,3	2,8
Заболевания органов дыхания	20,0	-	70,0	10,0
Заболевания желудочно-кишечного тракта	36,8	5,3	52,6	5,3
Рак легкого	32,9	21,4	37,1	8,6

Сравнительное исследование генетических особенностей групп людей с различной мультифакториальной патологией позволяет предположить, что гены системы детоксикации имеют большое значение в возникновении и развитии любой мультифакториальной патологии. При этом генетическая составляющая этиологии мультифакториальных заболеваний, детерми-

Национальная академия наук Беларуси

нированная этими генами, неоднородна и отличается при разных видах патологии, т.е. каждая из рассматриваемых групп характеризуется своим сочетанием генотипических и аллельных концентраций. Так, например, у больных раком легкого выявлена повышенная частота генотипа GSTM1(+)/GSTT1(-), а у пациентов с заболеваниями органов дыхания отмечалась повышенная частота генотипа GSTM1(-) / GSTT1(-) по сравнению с другими заболеваниями.

На сегодняшний день в литературе накоплены многочисленные, иногда противоречивые, данные об ассоциации полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с возникновением различных мультифакториальных заболеваний. Некоторые исследователи [9] считают, что эти противоречия могут быть разрешены если проводить изучение полиморфизма генов с учетом профессии, вредных привычек, пола, возраста и др. Именно такой подход позволяет выявить «субгруппы», в которых определенные генотипы обуславливают высокий риск развития заболеваний. В качестве примера может служить обнаруженная закономерность в отношении многих генов ФБК, в том числе и GST-ферментов: некурящие носители мутаций этих генов подвергаются большему риску развития мультифакториальных заболеваний по сравнению с некурящими носителями аллелей дикого типа, в то время как для курящих людей наличие мутантной аллели не имеет такого значения. Курение, являясь комплексным фактором риска, по-видимому, вовлекает множество других существенных механизмов развития заболевания, и генетическая предрасположенность в этом случае уже не является столь определяющей.

Для оценки того или иного генотипа как фактора риска, необходимы также знания о спектре канцерогенов, воздействию которых подвергается население той или иной территории. В зависимости от природы химических соединений, входящих в состав загрязнителей конкретной территории, может меняться степень риска, связанная с геном и его продуктом. Более того, то, что являлось фактором риска в одних условиях, может стать фактором устойчивости в других. Ответная защитная реакция организма зависит от путей поступления ксенобиотиков, их концентрации и длительности экспозиции, особенностей накопления в разных тканях [10].

В настоящее время нами начаты работы по изучению полиморфизма других генов битрансформации CYP1A1(фаза I) и NAT 2 (фаза II), также играющих важную роль в процессе детоксикации ксенобиотиков.

Заключение

Таким образом, знание индивидуальных генетических особенностей метаболизма позволит каждому человеку успешно оптимизировать состояние своего здоровья. А медики, опираясь на генетические исследования, могут разрабатывать эффективные индивидуальные программы профилактики и лечения мультифакториальных заболеваний на основе классических методов лечения.

Список использованных источников

1. Arand, M. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis ofthe glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms / M. Arand [et al.] // Anal Biochem. — 1996. — Vol. 236, № 1. — P. 184—186.

2. Ляхович, В.В. Роль ферментов биотрансформации ксенобиотиков в предрасположенности к бронхиальной астме и формировании особенностей ее клинического фенотипа / В.В. Ляхович [и др.] // Вестник РАМН — 2000. — № 12. — С. 36—41.

3. McLellan, R. et al. Characterisation of a human glutathione S-transferase μ cluster containing a duplicated GSTM1 gene that causes ultrarapid enzyme activity / R. McLellan [et al.] // Mol. Pharmacol. — 1997. — Vol. 52, .№ 6. — P. 958—965.

4. Баранов, В.С. и др. Генетические факторы предрасположенности и терапии эндометриоза / В.С. Баранов [и др.] // Генетика. — 1999. — Т. 35, № 2. — С. 243—248.

5. Гуляева, Л.Ф. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцеро-

Национальная академия наук Беларуси

генезе / Л.Ф. Гуляева, В.А. Вавилин, В.В. Лях-ович // Серия «Экология». — Новосибирск, 2000. — Вып. 57. — 85 с.

6. Xu, S. Characterization of the human class Mu glutathion S-transferase gene claster and the GSTM1 deletion / Xu, S. [et al.] // J. Boil. Chem. — 1998. — Vol. 52, № 6. — P. 3517 — 3527.

7. Garte, S. Metabolic susceptibility genes as cancer risk factors: time for reassessment // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. — 2001. — Vol. 10, № 12. — P. 1233 — 1240.

8. Hein, D.W., Grant, D.M., Sim, E. Update on consensus arylamine N-acetyltransferases nomenclature / D.W. Hein, D. M. Grant, E. Sim // Pharmacogenetics. — 2000. — Vol.10. — P. 291 — 292.

9. Meyer, U.A., Zanger, U.M. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drugs metabolism / U.A. Meyer, U.M. Zanger // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. — 1997. — Vol. 37. — P. 269 — 296.

10. Полоников, А.В. Гетерогенность аллергической и неаллергической форм бронхиальной астмы по делеционным полиморфизмам генов глутатион-S-трансфераз М1 и Т1 / А.В. Полоников [и др.] // Медицинская генетика. — 2005. — Т. 4, № 6. — С. 252 — 253.

Дата поступления статьи 27 марта 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 575.224.4/575.224.6

Н.И. Рябоконь, Н.В. Никитченко, О.В. Даливеля, Р.И. Гончарова

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ГЕНОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ОДНОГО ИЗ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-ДИГИДРОПИРИДИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Производные 1,4-дигидропиридина (1,4-ДГП) представляют широкую группу синтетических препаратов с уже известными фармакологическими свойствами. Среди них особое место занимают хорошо известные кардиоваскулярные препараты, несколько поколений которых уже применяется в медицине [1]. Некоторые производные 1,4-ДГП обладают нейромодуляторными свойствами как антиконвульсанты и протекторы от нейродефицита и стрессовых факторов [2]. Известно о способности производных 1,4-ДГП модулироватьуровень кортикостериодных и других гормонов [3], а также их антидиабетической [4, 5] и противовоспалительной активности [6]. Имеются сведения о геропротекторных [7], антинеопластических [8] и радиопротекторных [9] свойствах 1,4-ДГП-ов. Обнаружено около 30 препаратов из серии 1,4-ДГП, которые обладают местным (контактным) защитным эффектом против радиационного дерматита, вызванного бета- и рентгеновским облучением, и эффективность которых превышает эффективность хорошо известных радиопротекторов цистамина и мексамина [9]. Имеется положительный опыт применения одного из производных 1,4-ДГП диэтона в радиотерапевтических клиниках для предотвращения лучевых поражений кожи [9].

Нашей лабораторией к настоящему времени выявлены 7 производных 1,4-ДГП, обладающих генопротекторными свойствами, т.е. способностью защищать геном клеток от спонтанных, химически- и радиационно-индуцированных повреждений, что открывает новые перспективы применения этой группы соединений. Так, на различных модельных объектах *in vitro* и *in vivo* показана высокая генопротекторная эффективность и ее связь с химической структурой данных соединений [10-15]. Установлено влияние и некоторые механизмы действия исследуемых препаратов на репарацию ДНК [11, 14]. В частности, обнаружено, что препарат AV-153 как один из наиболее перспективных производных 1,4-ДГП характеризуется широким диапазоном активных концентраций, увеличивая до 70 % эффективность и до 40 % скорость эксцизионной репарации оснований ДНК (BER) в лимфоцитах периферической крови здоровых доноров *in vitro* и в культуре опухолевых клеток при различных типах генотоксического воздействия, включая окислительный стресс, ионизирующее облучение и алкилирование [14, 16]. Показана прямая связь между генопротекторной эффективностью данного препарата и количеством стимулированного им синтеза поли(ADP-рибозы), участвующей в репарации ДНК [16]. Однако, ранее проведенные исследования генопротекторной активности препарата AV-153 на клетках человека выполнены с использованием различных опухолевых линий клеток и лимфоцитов периферической крови лишь одного донора [14]. В настоящей работе представлены результаты исследований, проведенных на большой выборке здоровых доноров, лимфоциты периферической крови которых изучены *in vitro* с использованием различных тестов. Проведен сравнительный анализ полученных данных с результатами исследований на других типах клеток человека и при различных генотоксических воздействиях.

Национальная академия наук Беларуси

Материалы и методы

Исследуемый препарат из группы 1,4-ДГП-ов 3,5-бис-этоксикарбонил-2,6-диметил-1,4-дигидропиридин-4-карбоксилат натрия (AV-153) синтезирован в Латвийском Институте органического синтеза. Стоковые растворы препарата приготовлены на питательной среде RPMI-1640 (Sigma - Aldrich).

Лимфоциты периферической крови выделены из венозной крови, полученной от 10 доноров-добровольцев женского пола в возрасте до 40 лет без видимых симптоматических заболеваний, при использовании градиента плотности в растворе Histopaque-1077 (ICN). Инкубация лимфоцитов проведена в питательной среде RPMI-1640 со всеми добавками (10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина и 0,1 % гентамицина) при 37°C и 5 % CO_2.

Оценка выживаемости лимфоцитов проведена через 24 и 48 ч инкубации с AV-153. Применялись камера Бюркера и стандартный тест с цитоплазматическим красителем трипановым синим, добавленным к образцам, согласно протоколу производителя (Sigma - Aldrich).

Для оценки спонтанных и радиационно-индуцированных первичных повреждений ДНК in vitro был использован щелочной гель-электрофорез одиночных клеток, или метод ДНК-комет (комет-оценки, Comet assay) [17, 18]. Анализ 100 клеток на образец выполнен с применением флуоресцентного микроскопа фирмы Leica и классификации комет, согласно стандартам, разработанным A. Collins [19].

Оценка спонтанных и радиационно-индуцированных микроядер (МЯ) проведена с использованием микроядерного теста на двуядерных (бинуклеарных) лимфоцитах, согласно стандартным международным протоколам [20, 21]. Анализ препаратов выполнен на световом микроскопе производства фирмы Carl Zeiss при 600-кратном увеличении. Частоту МЯ оценивали на 1000 бинуклеарных клеток.

Статистический анализ данных выполнен в пакете прикладных программ STATISTICA (Statsoft Inc., USA) с использованием t-критерия Стьюдента и регрессионного анализа. Все эксперименты были проведены в нескольких повторностях. Эффективность генопротекторной активности исследуемого препарата оценивали по формуле:

$$RF = ((DD_0 - DD_{av})/DD_0) \times 100\ (\%),$$

где RF — эффективность (reduction factor) препарата, выраженная в процентах, DD_0 — регистрируемый уровень эндогенных или индуцированных повреждений ДНК или микроядер и DD_{av} — уровень повреждений ДНК или микроядер после инкубации клеток в присутствии AV-153.

Результаты и обсуждение

Влияние исследуемого препарата на выживаемость лимфоцитов. Результаты теста с трипановым синим показали, что снижение выживаемости лимфоцитов после 24- и 48-часовой инкубации в присутствии AV-153 происходит лишь при очень высокой концентрации препарата, равной и более 5×10^{-2} М (Рис. 1). Даже при концентрации препарата $2{,}5\times10^{-1}$ М выживаемость лимфоцитов сохраняется на достаточно высоком уровне, равном 47 %.

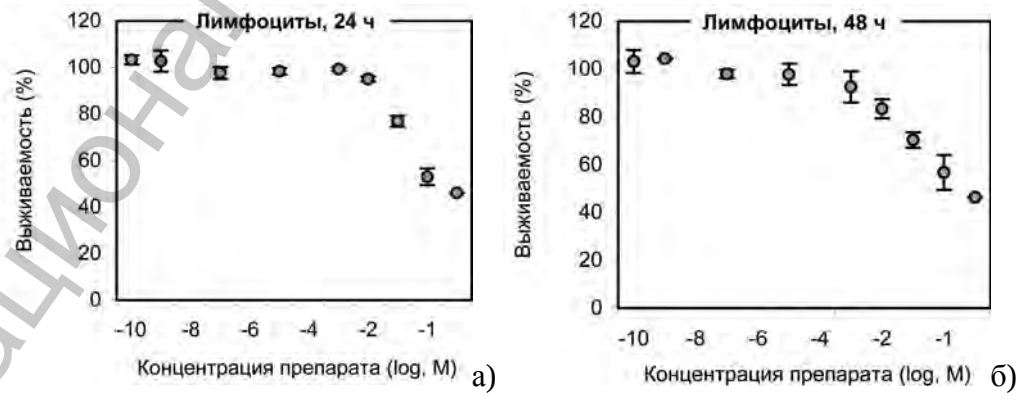


Рис.1. Влияние исследуемого препарата на выживаемость лимфоцитов после (а) 24 и (б) 48 ч инкубации.

Национальная академия наук Беларуси

Расчеты показали высокое значение IC_{50}, достигающее 290,62±54,69 мМ, что свидетельствует о низкой цитотоксичности препарата для лимфоцитов человека. Сравнительный анализ данных показал, что установленная токсичность препарата для лимфоцитов человека на 2 порядка меньше таковой для опухолевых клеток крови (Raji и HL-60) [14], что может быть связано с более высокой чувствительностью опухолевых клеток по сравнению с нормальными клетками к токсическому и генотоксическому действию различных экзогенных факторов.

Влияние препарата на уровень первичных повреждений ДНК. Установлено отсутствие генотоксического эффекта препарата в широком диапазоне концентраций (до 10^{-6} М включительно) для клеток здоровых доноров *in vitro*. Более того, обнаружено снижение уровня эндогенных (Рис. 2, Табл. 1) и радиационно-индуцированных (Табл. 1) первичных повреждений ДНК при использовании препарата в диапазоне концентраций от 10^{-10} до 10^{-6} М. Наиболее значимый защитный (генопротекторный) эффект AV-153 наблюдался при концентрациях 10^{-8}-10^{-10} М. Выявлено, что в диапазоне от 10^{-11} до 10^{-9} М зависимость концентрация - эффект описывается логарифмической функцией. Аналогичные данные получены нами ранее при использовании различных линий клеток [14].

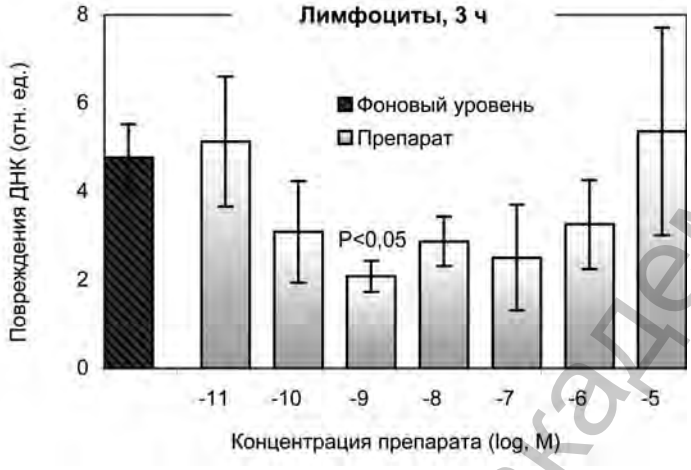


Рис.2. Исследуемый препарат в широком диапазоне концентраций существенно снижает частоту эндогенных повреждений ДНК в лимфоцитах человека после 3 часовой инкубации *in vitro*. P<0,05 по сравнению с фоновым уровнем (t-критерий Стьюдента).

Таблица 1.

Эффективность исследуемого препарата в редукции повреждений ДНК, возникающих спонтанно или индуцированных в лимфоцитах здоровых доноров, а также в миелолейкозной линии клеток HL-60 и лимфомной линии клеток Raji *in vitro* (Comet assay)

Концентрация препарата	Редуцированные повреждения ДНК, средние данные ± SE (%)					
	Эндогенные повреждения ДНК		H_2O_2 (100 μM)	Гамма-облучение (2 Гр)		ЭМС (100 μM)
	Лимфоциты	HL-60*	Raji*	HL-60*	Лимфоциты	Лимфоциты*
10^{-11} М	8,12±4,89	–	3,97±1,68	–	–	–
10^{-10} М	40,82±15,23	–	7,35±2,17	–	***68,11±10,89***	–
10^{-9} М	***53,71±8,27****	13,44±1,56	***37,05±12,24***	–	***61,07±14,00***	***46,38±11,08***
10^{-8} М	40,56±7,38	***44,01±1,44***	24,04±2,40	13,72±0,7	-	–
10^{-7} М	50,30±13,08	38,73±11,73	14,71±3,74	9,69±2,69	28,77±6,75	31,90±16,16
10^{-6} М	31,72±9,72	32,21±9,21	3,00±1,24	4,63±3,63	-	–
10^{-5} М	-6,25±2,25	25,17±9,17	0,73±4,04	1,52±0,49	10,95±3.07	8,17±4,89

*Ранее полученные данные [14]; ** жирным курсивом обозначены максимальные значения.

Национальная академия наук Беларуси

Зарегистрирована высокая эффективность препарата в редукции повреждений ДНК как в нормальных, так и в опухолевых клетках (Табл. 1). При этом, максимальные средние величины эффективности препарата достигают 70 % и наблюдаются при низких концентрациях препарата. Лишь высокие концентрации препарата (от 10^{-5} М и более) могут проявлять незначительный генотоксический эффект, о чем свидетельствуют данные по лимфоцитам здоровых доноров (Табл. 1, эндогенные повреждения). Обнаруженная высокая эффективность препарата для клеток человека *in vitro* находится в соответствии с результатами исследований проведенных *in vivo* на модельном объекте *Drosophila melanogaster* [10, 11].

Влияние исследуемого препарата на частоту микроядер. Генопротекторный эффект препарата зарегистрирован также на хромосомном уровне при использовании микроядерного теста на бинуклеарных лимфоцитах здоровых доноров. При этом, как и в случае с первичными повреждениями ДНК, эффективность препарата была максимальной при низких концентрациях и достигала 50 % (Табл. 2).

Таблица 2

Эффективность исследуемого препарата в редукции микроядер, индуцированных *in vitro* в лимфоцитах здоровых доноров гамма-облучением в дозе 2 Гр

Концентрация препарата	Редуцированные частоты микроядер, среднее ± SE (%)
10^{-10} М	48,32 ± 10,12
10^{-9} М	***50,37 ± 15,85****
10^{-7} М	35,35 ± 8,37
10^{-5} М	19,61 ± 2,69

* жирным курсивом обозначены максимальные значения

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что перспективный препарат из серии 1,4-ДГП обладает высокой генопротекторной активностью в сочетании с низкой токсичностью для клеток здоровых доноров, что находится в соответствии с данными, полученными ранее с использованием опухолевых клеток человека.

Представленная работа выполнена в рамках проектов, финансируемых Государственной комплексной программой научных исследований «Биологическая инженерия и биобезопасность», БРФФИ (№ договора Б07-223), а также в рамках международного сотрудничества между Институтом генетики и цитологии НАНБ, Латвийским Институтом органического синтеза (г. Рига, Латвия) и Центром Онкологии (г. Гливице, Польша).

Список использованных источников

1. Effect of cerebrocrast on the function of human platelets and release of the arachidonic acid from plasma membrane / J. Briede [et al.] // Cell Biochem. Funct. — 2002. — Vol. 20 — P. 177—181.

2. «Atypical» neuromadulatory profile of glutapyrone, a representative of a novel ‘class’ of amino acid-containing dipeptide-mimicking 1,4-dihydropyridine (DHP) compounds: in vitro and in vivo studies / I. Misane [et al.] // Eur. Neuropsychopharmacol. — 1998. — Vol. 8. — P. 329—347.

3. Influence of different types of the 1,4-dihydropyridine derivatives on rat plasma corticosterone levels / E. Liutkevičius [et al.] // Biomedical Letters. — 1999. — Vol. 60. — P. 39—46.

4. Effect of some 1,4-dihydropyridine Ca antagonists on the blast transformation of rat spleen lymphocytes / J. Briede [et al.] // Cell Biochem. Funct. — 1999. — Vol. 17. — P. 97—105.

5. Effect of cerebrocrast on the lympho cytea blast transformation activity in normal and streptozotocin-

Национальная академия наук Беларуси

induced diabetic rats / J. Briede [et al.] // Cell Biochem. Funct. —1999. — Vol. 17. — P. 89—96.

6. Anti-inflammatory effects of cerebrocrst in a model of rat paw edema and on mononuclear THP-1 cells / A. Klegeris [et al.] // Eur. J. Pharmacol. — 2002. — Vol. 441. — P. 203—208.

7. Геропротекторная активность 2,6-диметил-3,5-диоксикарбонил-1,4-дигидро-пиридина / Н.М. Эмануэль [и др.] // Докл. Акад. Наук СССР. — 1998. — Т. 284. — С. 1271—1274.

8. Антинеопластический эффект глутапирона при хроническом гамма-облучении крыс / Л.П. Ваританян [и др.] // Радиац. Биол. Радиоэкол. — 2004. — Т. 44. — № 2. — С. 198—201.

9. Радиомодифицирующие свойства производных 1,4-дигидропиридина и 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-декагидроакридин-1,8-диона / Е.В. Иванов [и др.] // Радиац. Биол. Радиоэкол. — 2004. — Т. 44. — № 5. — С. 550—559.

10. Сравнительное изучение антимутагенного действия соединений дигидропиридинового ряда в связи с их антиоксидантной активностью / Р.И. Гончарова [и др.] // Докл. АН СССР. — 1980. — Т. 225. — № 6. — С. 1483—1486.

11. Кужир, Т.Д. Антимутагены и химический мутагенез в системах высших эукариот / Т.Д. Кужир. — Минск: Тэхналогія, 1999. — 267 с.

12. Anticlastogenicity of two derivatives of 1,4-dihydroisonicotinic acid in mouse micronucleus test / R. Goncharova [et al.] // Mutat. Res. — 2001. — Vol. 496. — P. 129—135.

13. Promising antimutagen for improving reproductive indices of stripped fishes and the quality of their progeny / R. Goncharova [et al.] // EAS Special Publication. — 2002. — №.31. — P. 63—70.

14. A 1,4-dihydropyridine derivative reduces DNA damage and stimulate DNA repair in human cells in vitro / N.I. Ryabokon [et al.] // Mutat. Res. — 2005. — Vol. 587. — P. 52—58.

15. Effects of 1,4-dihydropyridine series on cell survival and DNA damage in L5178Y murine sublines / O. Dalivelya [et al.] // Nukleonika. — 2006. — Vol. 51. — № 3. — P. 141—146.

16. Changes in poly(ADP-ribose) level modulate the kinetics of DNA strand break rejoining / N.I. Ryabokon [et al.] // Mutat. Res. — 2008. — Vol. 637. — № 1–2. — P. 173—181.

17. UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: a potential diagnostic technique / M.H.L. Green [et al.] // Mutat. Res. — 1992. — Vol. 273. — P. 137—144.

18. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing / R.R. Tice [et al.] // Environ. Mol. Mutagenesis. — 2000. — Vol. 35. — P. 206—221.

19. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA / A. Collins [et al.] // Carcinogenesis. — 1993. — Vol. 14. — P. 1733—1735.

20. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide / M. Fenech [et al.] // Mutagenesis. — 1999. — Vol. 14. — № 6. — P. 605—612.

21. SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study / E. Lorge [et al.] // Mutat. Res. — 2006. — Vol. 607. — № 1. — P. 13—36.

Дата поступления статьи 4 апреля 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 616.8-056.7-071

С.А. Лихачев, И.В. Плешко

ОРГАНИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЕЙ: ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ СОВРЕМЕННОГО ЭТАПА

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии» МЗ РБ
Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Скорины, 24

Введение

Достижения молекулярной генетики на современном этапе вносят неоценимый вклад в процесс глубокого познания этиологии и патогенеза наследственных заболеваний человека, создание методов генетической диагностики, профилактики и генной терапии. Это стало возможным в результате международной интеграции науки и объединения усилий ученых различных областей, реализации международного проекта «Геном человека» по определению структуры наследственного материала человека [1].

Изучение наследственных заболеваний нервной системы представляет собой сложную задачу не только современной нейрогенетики, но и клинической неврологии. Это связано с наличием характерных особенностей, отличающих нейрогередитарные заболевания от другой патологии нервной системы. Манифестация в трудоспособном возрасте, неуклонно прогрессирующее течение, отсутствие эффективных методов лечения, ранняя инвалидизация, развитие психических изменений, а в некоторых случаях неизбежный летальный исход обуславливают актуальность и настоятельную необходимость дальнейшего изучения данной патологии [1—5].

Существование выраженного фенотипического полиморфизма обуславливает развитие клинических признаков заболеваний, кардинально различающихся у представителей даже одной семьи. В этих случаях неврологическая симптоматика характеризуется как классическими развернутыми формами, так и разнообразными атипичными и «стертыми» клиническими проявлениями [1, 4—8]. Ярким примером подобной манифестации является генерализованная дистония, которая характеризуется нерегулярным и неритмичным изменением мышечного тонуса, появлением насильственных движений шеи, туловища и конечностей, формированием патологических поз, развитием контрактур [1—7]. Распространенность генерализованной формы составляет 3,4 на 100000 населения, фокальных форм 30 на 100000 населения [2, 3]. На основе изучения клинического полиморфизма были выделены ригидная и гиперкинетическая формы торсионной дистонии, обусловленные противоположными изменениями метаболизма дофаминергических, серотонинергических, холинергических структур головного мозга и обозначенные как ДОФА-зависимая (ригидная) и ДОФА-независимая (гиперкинетическая) дистонии [1, 4]. Важным для практической неврологии является существование разнообразных атипичных и «стертых» клинических проявлений ригидной формы дистонии в виде изолированного постурального тремора рук, паркинсонизма, фокальных дистоний, атетоидного церебрального паралича, спастической параплегии, непостоянной эквиноварусной позы стоп [1, 4, 6]. Гиперкинетическая (ДОФА-независимая) торсионная дистония в типичных случаях характеризуется развитием генерализованных насильственных движений с дебютом болезни до 11 лет. Известны атипичные и «стертые» проявления данного страдания в виде заикания, легкого статокинетического тремора рук, фокальных (писчий спазм), мультифокальных и сегментарных форм с началом в возрасте до 30 лет [1, 4, 6]. В литературе приводятся описания семей с преобладающими клинически атипичными проявлениями торсионной дистонии [7].

Национальная академия наук Беларуси

Кроме того, различные генетические дефекты могут иметь единые клинические и морфологические признаки заболеваний [1, 3]. Такие наблюдения отмечены при ювенильном паркинсонизме, для которого характерен аутосомно-рецессивный тип наследования и развитие первых симптомов до 4-го десятилетия жизни. Отличают ювенильный паркинсонизм от болезни Паркинсона частое наличие дистонического синдрома, пирамидных знаков, флюктуации симптомов в течение дня, отсутствие тремора покоя, когнитивных и психических нарушений, а также медленное прогрессирование заболевания. После выделения гена аутосомно-рецессивного ювенильного паркинсонизма, кодирующего белок паркин, были выявлены случаи клинических проявлений генерализованной ДОФА-зависимой дистонии у носителей мутаций в гене паркина [1, 3].

При некоторых наследственных болезнях нервной системы отсутствует четкое соответствие между клиническими признаками и морфологическими изменениями, а наличие вариабельности и тяжести мутаций определяют широкий полиморфизм последних. Эти факторы значительно затрудняют диагностику, а также вопрос систематизации наследственных нейрогередитарных заболеваний. Таким примером явились сложности в создании классификации наследственных атактических синдромов, что предпринималось неврологами различных стран мира в течение более чем 100 лет. Наследственные атаксии — гетерогенная группа наследственных заболеваний нервной системы, при которых ведущим клиническим признаком является эпизодическое или постоянное нарушение координации движений. Средняя распространенность наследственных атаксий составляет около 3 — 10 на 100 000 населения в различных популяциях мира. Для наследственных атаксий характерны разнообразные клинические проявления при идентичном генетическом дефекте, наличие «переходных» или «смешанных» форм, случаи с атипичными и «стертыми» проявлениями заболеваний. Кроме того, различные генетические дефекты могут иметь сходную клиническую симптоматику, особенно на поздних стадиях болезни. Современная классификация включает прогрессирующие аутосомно-доминантные и аутосомно-рецессивные атаксии, врожденные мозжечковые атаксии, метаболические атаксии и другие формы. В патологический процесс в разных комбинациях могут вовлекаться различные отделы мозжечка, ствола мозга, проводящие пути спинного мозга и другие структуры нервной системы [1, 9].

В переводе с греческого языка атаксия — беспорядочность, дискоординация. Впервые описание пациентов с наследственной формой атаксии было сделано немецким неврологом Н. Фридрейхом во второй половине 19 века. Болезнь Фридрейха является наиболее часто встречающейся формой и относится к группе аутосомно-рецессивных наследственных атаксий. Чаще заболевание начинается в возрасте до 20 лет с атаксии в нижних конечностях. Пациентов начинает беспокоить неустойчивость в положении стоя и при ходьбе. Постепенно атаксия распространяется на мышцы туловища, рук и лица. Развиваются слабость мышц, снижение их тонуса и дистальные амиотрофии, более выраженные в нижних конечностях. При болезни Фридрейха проявления со стороны нервной системы сочетаются с экстраневральными изменениями. К ним относятся скелетные аномалии в виде изменения формы стопы по типу «полой» (так называемая «стопа Фридрейха» — высокий свод стопы с переразгибанием пальцев в основных фалангах и сгибанием в дистальных); деформации позвоночника и грудной клетки в виде кифосколиоза. Подобные аномалии можно обнаружить среди родственников пациентов, страдающих данным заболеванием. У некоторых больных наблюдаются поражения сердечной мышцы (кардиомиопатия), а также эндокринные расстройства, включающие сахарный диабет, инфантилизм, ожирение, аномалии развития половых органов. Течение заболевания неуклонно прогрессирующее. При наличии «мягких» мутаций в гене фратаксина болезнь может протекать в легкой форме и характеризоваться более поздним началом, отсутствием «обязательных» симптомов и благоприятным течением [1, 9]. Это существенно меняет представления об эпидемиологии данной патологии, принципах диагностики и лечения части редких атактических синдромов.

Современная геномная классификация аутосомно-доминантных спиноцеребеллярных атаксий была осуществлена в связи с открытием соответствующих генов или хромосомных

Национальная академия наук Беларуси

локусов для каждой отдельной формы. Клиническая картина их очень разнообразна и в значительной степени определяется характером генетического дефекта. Заболевание начинается после 2-3-го десятилетия жизни, хотя известны как более поздние формы, так и случаи с началом до 20 лет. Часто прогрессирующая мозжечковая атаксия сочетается с дополнительными неврологическими симптомами, свидетельствующими о множественном поражении нервной системы. К таким дополнительным признакам относятся изменения в рефлекторной сфере, спастический тонус в конечностях, экстрапирамидные расстройства, деменция, эпилептические припадки, атрофия зрительных нервов, поражение периферических нервов конечностей. Все симптомы могут появляться в различных комбинациях и в различной последовательности, но преобладающим в клинической картине является синдром мозжечковой атаксии. При некоторых формах наблюдается длительное течение заболевания с медленным нарастанием симптомов на протяжении 3-4 десятилетий. При выраженном генетическом дефекте и начале болезни в молодом возрасте возможно быстрое и даже «подострое» течение процесса [1, 9].

К группе аутосомно-доминантных атаксий относятся также эпизодические атаксии, характеризующиеся повторными приступами координаторных нарушений различной длительности и интенсивности, иногда в сочетании с другими неврологическими симптомами. Пароксизмы отмечаются с частотой от нескольких в день до 1-2 в месяц и обычно начинаются в детском возрасте. Существует несколько форм эпизодических атаксий с клинической и генетической точки зрения. При эпизодической атаксии 1-го типа пароксизмы мозжечковой атаксии провоцируются резкими движениями, испугом и другими эмоциональными факторами. Приступы кратковременные (от нескольких секунд до нескольких часов), сопровождаются тошнотой, рвотой, головокружением, дизартрией. При эпизодической атаксии 2-го типа пароксизмы мозжечковой атаксии более длительные и могут продолжаться до нескольких дней. Провоцирующими факторами являются эмоциональные и физические перегрузки, прием алкоголя и кофе. В межприступном периоде выявляются расстройства координации, которые с течением времени могут нарастать. С патогенетической точки зрения эпизодические атаксии относятся к каналопатиям, обусловленные мутациями генов различных ионных каналов. Нарушение клеточных механизмов проницаемости и возбудимости мембран нейронов лежит в основе пароксизмальных проявлений эпизодических атаксий. Пароксизмальность, а также характерные клинические особенности эпизодических атаксий делают их схожими с цереброваскулярными синдромами, другими формами аутосомно-доминантных атаксий, миастений, что диктует необходимость их молекулярно-генетической диагностики в повседневной практике невролога.

В некоторых случаях прямая ДНК-диагностика является очень сложной задачей вследствие разнообразия мутаций и большого размера гена, как, например, при гепатолентикулярной дегенерации. В такой ситуации знание наиболее часто встречающегося спектра мутаций, характерного для данной популяции, значительно упрощает проведение генетической диагностики и позволяет предотвратить развитие заболевания. Как известно, гепатолентикулярная дегенерация или болезнь Вильсона-Коновалова является редким примером наследственной патологии, при которой существуют эффективные методы лечения при своевременном их назначении. Это тяжелое аутосомно-рецессивное заболевание характеризуется поражением нервной системы и внутренних органов вследствие генетически обусловленного нарушения обмена меди. Через 5-10 лет от начала заболевания постепенно развиваются поражение печени, экстрапирамидные гиперкинезы, ригидность, парезы, эпилептические пароксизмы, интеллектуальное снижение, психические расстройства, приводящие к неизбежному летальному исходу [1—3,10].

Материалы и методы

Проводилось изучение наследственных заболеваний нервной системы у больных, находящихся на амбулаторном обследовании и стационарном лечении в РНПЦ неврологии и

Национальная академия наук Беларуси

нейрохирургии за период с 2006 по 2008 годы. Регистрировались паспортные данные, особенности наследственного анамнеза, возраст начала и срок заболевания, тяжесть симптоматики, наличие группы инвалидности.

Все больные проходили комплексное клинико-нейрофизиологическое исследование. Клиническая часть включала неврологический осмотр, консультации специалистов по показаниям (отоневролога, офтальмолога, психиатра, терапевта и др.). Нейрофизиологическое обследование включало проведение по показаниям электронейромиографии, вестибулометрии, электроэнцефалографии, зрительных и слуховых вызванных потенциалов, магнитно-резонансной или компьютерной томографии, стабилометрии и др.

Молекулярно-генетическое исследование больных с наличием дофа-независимой дистонии проводилось на базе ГУ РНПЦ «Мать и дитя».

Результаты и обсуждение

Проведена работа по изучению эпидемиологии, результатов клинических и нейрофизиологических исследований больных с мышечными дистониями в Республике Беларусь. На конец 2007 года зарегистрировано 505 пациентов с различными формами мышечных дистоний, из них семейные формы мышечных дистоний (19 человек из 14 семей) составили 3,8 % от всех состоящих на учете в республике случаев мышечных дистоний.

Ведется работа по изучению семейных форм паркинсонизма, больных с ранним началом заболевания и ювенильным паркинсонизмом; пациентов с хореей Гентингтона и болезнью Вильсона-Коновалова.

Продолжается сбор информации о состоящих на диспансерном учете больных с другими формами нейрогередитарных заболеваний по данным рассылки писем в неврологические подразделения лечебно-профилактических учреждений республики.

Заключение

Перечисленные особенности наследственных болезней нервной системы составляют лишь незначительную часть существующих проблем, осложняющих работу практического невролога и играющих огромную роль в состоянии здоровья нашего населения. Поэтому дальнейшее их изучение является особенно важным и необходимым. В РНПЦ неврологии и нейрохирургии проводится работа по созданию базы данных больных с наследственной патологией нервной системы, изучение эпидемиологии данных заболеваний. В настоящее время такая работа завершена в отношении больных с мышечными дистониями. Это позволило организовать для всех больных с данной патологией современное лечение, снизить временную и стойкую нетрудоспособность и повысить качество жизни этих людей. Мы надеемся, что дальнейшее изучение других форм нейрогередитарных заболеваний также позволит достигнуть успеха, в первую очередь путем медико-генетического консультирования и снизить их число.

Список использованных источников

1. Иллариошкин, С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии / С.Н. Иллариошкин, И.А. Иванова-Смоленская, Е.Д. Маркова. — М.: МИА, 2002.

2. Яхно, Н.Н. Болезни нервной системы т. 2 / Н.Н. Яхно, Д.Р. Штульман — М. «Медпресс-информ», 2002.

3. Шток, В.Н. Экстрапирамидные расстройства / В.Н. Шток, И.А. Иванова-Смоленская, О.С. Левин. — М. «Медпресс-информ», 2002.

4. Молекулярная генетика наслед-ственных дистонических синдромов / С.Н. Иллариошкин [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. — 2000. — № 8.— С. 60—66.

Национальная академия наук Беларуси

5. Штульман, Д.Р. Неврология / Д.Р. Штульман, О.С. Левин. — М. «Медпресс-информ», 2002.

6. Миклина, Н.И. Молекулярно-генетический анализ торсионной дистонии: автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.00.13 / Н.И. Миклина; ГУ НИИ РАМН. — М., 1999. — 18 с.

7. Atypical phenotypes and clinical variability in a large Italian family with DYT1-primary torsion dystonia. / M. Gambarin [et. al.] // Mov Disord. — 2006. — Vol. 21, № 10. —P. 1782—1784.

8. Defective temporal processing of sensory stimuli in DYT1 mutation carriers: a new endophenotype of dystonia? / M Fiorio [et. al.] // Brain. 2007. — Vol. 130, № 1. — P. 134—142.

9. Иллариошкин, С.Н. Наследственные атаксии и параплегии / С.Н. Иллариошкин, Е.Г. Руденская, О.С. Иванова-Смоленская [и др]. / М. «Медпресс-информ», 2006.

10. Wilson disease: description of 282 patients evaluated over 3 decades. /.A.B. Taly [et. al.] // Medicine (Baltimore). — 2007. — Vol. 86, №2. — P. 112—121.

Дата поступления статьи 14 марта 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 575.174.015.3:616(476)

Л.Н. Сивицкая, Е.И. Кушнеревич, Н.Г. Даниленко, О.Г. Давыденко

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РИСКА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В БЕЛАРУСИ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются итогом последовательных и взаимосвязанных событий, приводящих к ремоделированию сердца, сердечной недостаточности и смертельному исходу. По данным ВОЗ, ССЗ являются главной причиной смертности во всем мире — на них приходится около 30 % от всех случаев смерти, из которых 80 % составляет смертность в странах с низким и средним уровнем доходов — страны Азии и Восточной Европы [1]. По данным Минздрава РБ, сердечно-сосудистая патология занимает первое место среди причин смерти у населения Беларуси — более 55 %, из них четверть приходится на людей трудоспособного возраста [2].

За генетическую детерминацию ССЗ ответственно более 50 генов, продукты которых напрямую или косвенно вовлечены в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, гены, которые вносят вклад в развитие данной патологии, часто ассоциированы с продолжительностью жизни [3, 4].

В связи с этими обстоятельствами весьма актуальным является изучение распространения аллелей и генотипов риска генов-кандидатов ССЗ у белорусов.

В этиологии ССЗ и, в частности, атеросклероза большая роль отведена повреждению эндотелия сосудов, а также дислипидемии как следствие нарушения метаболизма липидов, поэтому особый интерес многих лабораторий мира прикован к изучению генетического полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксиси азота (*eNOS*), а также генов аполипопротеинов (*apo*) и липопротеинлипазы (*LPL*). Эндотелиальная синтаза окиси азота является конститутивным ферментом, катализирующим реакцию синтеза сильного вазодилятатора — NO. Нарушения в работе фермента *eNOS* могут привести к необратимым изменениям в стенках сосудов разных органов, что влечет за собой развитие атеросклероза, инсульта, гестоза, сахарного диабета и др. [5, 6, 7, 8].

Особую роль в этиологии ССЗ отводят генам аполипопротеинов, входящих в состав липопротеиновых частиц и регулирующих их обмен в организме человека. Расщепление липопротеинов для дальнейшего метаболизма осуществляет фермент липопротеинлипаза [9]. Согласованная работа этих механизмов поддерживает допустимый уровень липидов в крови. Генетический полиморфизм *LPL* и *apo*-генов особенно подробно изучается в связи с развитием атеросклероза, так как повышение уровня холестерина и других липидных компонентов крови — первое событие на пути атеросклероза [9, 10, 11].

В данной работе представлены исследования полиморфизмов трех генов-кандидатов сердечно-сосудистой патологии у населения Беларуси — *eNOS*, *apoE*, *LPL*.

Материалы и методы

В исследовании участвовали более 760 добровольцев, коренных жителей разных регионов Беларуси.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови добровольцев проводили по методу Mathew (1984) [12] с использованием неионогенного детергента тритона X-100 для лизиса эритроцитов, после чего лейкоциты лизировали додецилсульфатом натрия. Депротеинизацию осуществляли с помощью протеиназы К, экс-

Национальная академия наук Беларуси

тракцию ДНК — фенольно-хлороформенным методом. Идентификацию полиморфных аллелей каждого гена проводили раздельно методом ПЦР со специфическими праймерами по стандартному протоколу. Затем амплифицированные фрагменты генов *apoE* и *LPL* подвергали рестриктному анализу с использованием эндонуклеаз HhaI и HinfI, соответственно, согласно протоколу фирмы-производителя Fermentas (Литва). Визуализацию рестриктных фрагментов генов *apoE, LPL* проводили методом электрофореза в 8 %-полиакриламидном геле, продукта амплификации гена *eNOS* — в 5 % полиакриламидном геле.

Результаты и обсуждение

Изучение полиморфизма гена эндотелиальной синтазы окиси азота (eNOS) в популяции белорусов

У человека ген *eNOS* расположен на хромосоме 7q36 и состоит из 26 экзонов. В интроне 4 описан минисателлитный повтор, обусловленный разным числом тандемных последовательностей ДНК размером 27 п.н., так называемый *4a/b*-полиморфизм [13]. Наиболее распространенными являются 4- и 5-кратные повторы — аллели *4a* и *4b* соответственно. На рисунке 1 представлен ПЦР-анализ гена *eNOS*, используемый для индентификации его полиморфных аллелей.

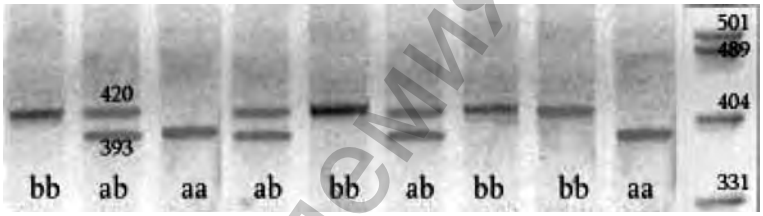


Рис. 1. Электрофореграмма фрагментов амплификации полиморфных аллелей гена *eNOS*. Снизу указаны генотипы, справа маркер длин pUC19/MspI.

У населения Беларуси встречаемость аллеля *4a* ранжируется в диапазоне 15,1—20,8 %, в среднем она составила 18,2 %, что согласуется с данными по европейским странам. Максимальным значением частоты данного аллеля характеризуется центральный регион страны, наименьшим — восток. По данным встречаемости аллеля *4a* гена *eNOS* среди населения страны построена карта распределения этого аллеля на территории Беларуси (Рис. 2). Следует отметить, что встречаемость аллеля *4a* на востоке страны сходна с таковой у населения России (Москва, 15,5 %), а на юге — с украинской популяцией (21,2 %), что говорит в пользу территориальной и этнической близости народов [14, 5].

Многочисленными исследованиями показано, что аллель *4a* ассоциирован с болезнями, получившими широкое распространение в последние десятилетия и определяющими продолжительность жизни человека. Так у гомозиготных носителей аллеля *4a* повышен уровень нитритов и нитратов в крови, напрямую связанный со скоростью выработки NO эндотелием сосудов, что свидетельствует о значимой роли генотипа *4a/4a* как фактора риска атеросклероза и других ССЗ. Подобная взаимосвязь была продемонстрирована в работах среди населения Европы, Японии, Турции и афроамериканцев [6, 7, 8]. Показано, что полиморфизм гена *eNOS* связан с нарушениями мозгового кровообращения у русских. В группах больных с ишемическим и геморрагическим инсультом повышена частота встречаемости аллеля *4a* и генотипов, содержащих этот аллель [15].

Опубликованы данные, где *4a/b*-полиморфизм гена *eNOS*, в частности аллель *4a*, ассоциирован с повышенным рисунком преэклампсии. У пациенток с этой патологией, имеющих хотя бы один аллель *4a*, обнаруживают повышенное диастолическое давление. А генотип *4a/4a* ассоциирован с более ранним началом и более тяжелым течением преэклампсии [16].

Национальная академия наук Беларуси

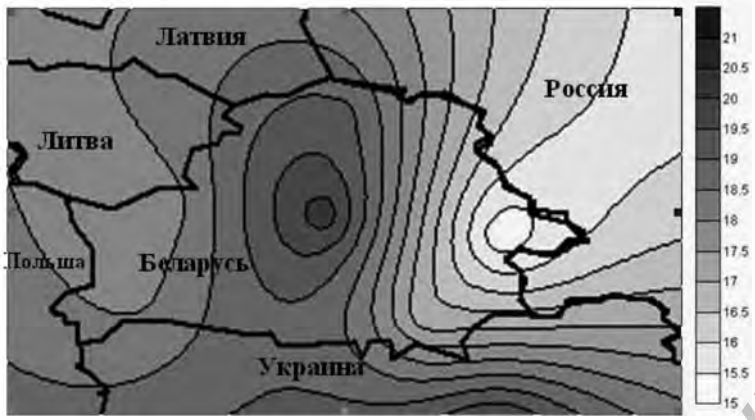


Рис. 2. Карта частоты встречаемости аллеля *4a* гена *eNOS* у населения Беларуси. Шкала отображает численные значения частот.

Изучение полиморфизма гена аполипопротеина Е (apoE) в популяции белорусов. Аполипопротеин Е играет ключевую роль в транспорте холестерина и является пептидом, ассоциированным с липопротеинами разных классов. Основным местом его синтеза являются клетки печени и мозга. В составе липопротеинов разных классов *apoE* осуществляет транспорт холестерина к периферическим тканям и обратно в печень, тем самым регулируя уровень холестерина в крови.

Ген аполипопротеина Е (*apoE*) локализован на хромосоме 19q13.2 и состоит из 4 экзонов. Генетический полиморфизм *apoE* обусловлен нуклеотидными заменами в экзоне 4; основными являются три аллеля — ε2, ε3, ε4 [17]. На рисунке 3 представлен рестрикционный анализ полиморфного участка гена apoE, используемый для выявления неблагоприятных генотипов.

Рис. 3. Электрофореграмма Hha1 фрагментов участка *apoE* гена. Справа указаны размеры фрагментов рестрикции, слева — маркер.

Аллель ε4 является генетическим фактором риска сердечно-сосудистой патологии. Это связано с тем, что общий уровень холестерина возрастает в ряду генотипов ε2/ε2, ε2/ε3, ε3/ε3, ε3/ε4, ε4/ε4. В отдельных работах выявлена ассоциация аллеля ε4 с уровнем систолического давления, риском артериальной гипертензии [18] и развитием мозгового инсульта [19].

По результатам данного исследования частота встречаемости аллеля риска ε4 в белорусской популяции составила 8,2 %, что ниже значений у граничащих с Беларусью жителей Польши (10,6 %) и России (Москва, 14,5 %) [20, 21]. Частоты встречаемости генотипов, содержащих неблагоприятный аллель ε4 у белорусов, распределились следующим образом: ε3/ε4 — 14,5 %, ε2/ε4 — 1,7 %, ε4/ε4 — 0,1 %.

Максимальная частота неблагоприятного аллеля ε4 выявлена на востоке Беларуси (12,0 %), что связано с достаточно высокой встречаемостью генотипов ε3/ε4 — 21,7 %.

На рисунке 4 представлена карта частоты встречаемости аллеля ε4 у жителей Беларуси. Согласно полученным результатам, на терри-

Национальная академия наук Беларуси

тории страны прослеживается четкий географический градиент: частота аллеля риска ε4 гена *apoE* увеличивается с северо-запада на юго-восток Беларуси.

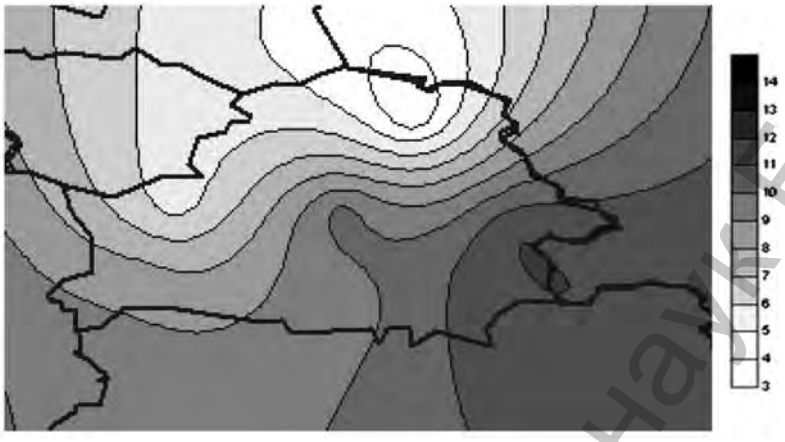


Рис. 4. Карта частоты встречаемости аллеля ε4 гена *apoE* у населения Беларуси. Шкала отображает численные значения частот.

Роль полиморфизма гена *apoE* в патогенезе сердечно-сосудистой патологии подтверждается ассоциациями этого гена с показателями смертности по причинам ССЗ и продолжительности жизни. Показана связь аллеля ε4 с повышенным риском смертности от ишемической болезни сердца (ИБС): частота этого аллеля снижена в выборке лиц старше 80 лет и среди пожилых больных с ИБС. Выявлено, что показатель смертности среди индивидуумов с генотипом ε3/ε4 в 2 раза выше, чем с ε3/ε3 генотипом [22].

Роль аполипопротеина Е в патогенезе болезни Альцгеймера (БА) активно изучается уже второе десятилетие. Вероятность развития болезни Альцгеймера в зависимости от генотипа *apoE* является дозозависимой. Подсчитано, что к 70-75 годам жизни у носителей ε4/ε4 риск БА составляет 90 %, у гетерозигот ε3/ε4 — 47 % [23].

Следует отметить, что из всей проанализированной популяции белорусов в 771 человек только один индивидуум из центрального региона Беларуси определен как гомозиготный носитель аллеля ε4; частота генотипа ε4/ε4 в целом по Беларуси приближается к 0,1 %, то есть 1:1000.

Частота встречаемости аллеля ε2 в Беларуси составляет лишь 5,6 %. Подобное значение показано и для популяции поляков [20] и русских (Москва) [21]. Гомозиготы ε2/ε2 в белорусской популяции встречаются с частотой 0,5 %. Есть данные о том, что носительство аллеля ε2 оказывает протективный эффект на развитие болезни Альцгеймера в течение всей жизни [23].

Изучение полиморфизма гена липопротеинлипазы (LPL) в популяции белорусов.

Липопротеинлипаза играет центральную роль в обмене липидов и энергетическом метаболизме человека. Главной функцией этого фермента является гидролиз плазменных триглицеридов, находящихся в составе липопротеиновых частиц. В случае если фермент дефектен, в крови значительно возрастает уровень липопротеинов, хиломикронов, холестерина и триглицеридов. При этом концентрация последних может увеличиваться в десятки раз. Накопление свободных триглицеридов в крови способствует образованию атеросклеротических бляшек, которые в конечном итоге могут привести к закупорке сосуда [24].

Ген, кодирующий липопротеинлипазу, — *LPL* — находится на хромосоме 8p22. Особый интерес представляет полиморфизм в 9 экзоне этого гена, обусловленный мутацией *C1595G*. Такая замена нуклеотидов приводит к образованию терминирующего кодона (*Ter*) в 447-ой позиции белка вместо остатка серина (*Ser*) — *Ser→Ter*. В противоположность другим полиморфиз мам эта мутация ассоциирована с

Национальная академия наук Беларуси

благоприятным эффектом на метаболизм липидов и атеропротекцией [24, 25].

На рисунке 5 представлен рестрикционный анализ полиморфного участка гена *LPL*.

В белорусской популяции частота аллеля *447Ter* составила в среднем 6,9 %, что близко к данным, полученным в популяции русских (6,2 %). Следует отметить, что частота *447Ter* в Беларуси варьирует в широком диапазоне 3,6 — 10,5 %. Наибольшая его частота выявлена в центральном регионе, что полностью обусловлено значительной долей гетерозигот в этой популяции — 21 %, в то время как в других регионах Беларуси этот показатель в 1,5—3,5 раза ниже.

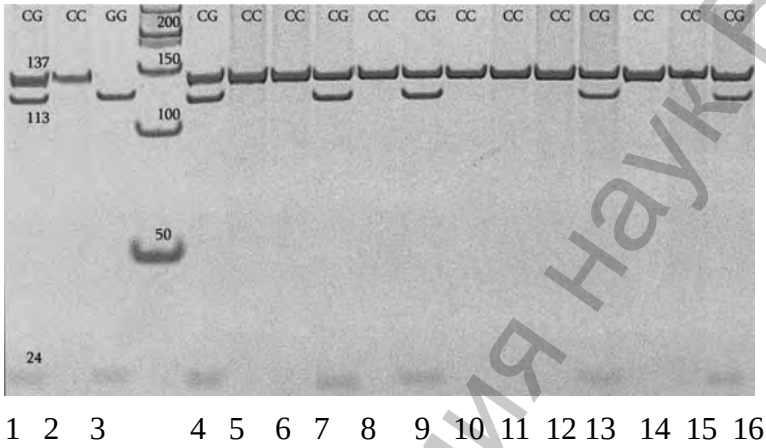


Рис. 5. Электрофореграмма длин рестриктных фрагментов гена *LPL*. Дорожки 1,4,7,9,13,16 — гетерозиготы *Ser/Ter*, дорожка 3 — гомозигота *Ter/Ter*, дорожки 2,5,6,8,10-12,14,15 — гомозиготы *Ser/Ser*, маркер длин — 50+1,5 bp.

Полученные данные по *Ser447Ter*-полиморфизму говорят в пользу сниженного риска развития атеросклероза у жителей центра страны, так как носительство хотя бы одного аллеля *447Ter* демонстрирует благоприятный липидный профиль крови.

Следует отметить, что из всей проанализированной популяции белорусов только 5 человек из 760 являются гомозиготными носителями протективной замены *Ser→Ter*. В среднем в Беларуси частота генотипа *Ter/Ter* составляет 0,7 %.

По данным генотипирования составлена карта распределения частоты протективного аллеля *447Ter* гена липопротеинлипазы в Беларуси (рисунок 6). Согласно полученным результатам, на территории страны прослеживается четкий географический градиент распространения данного аллеля: частота *447Ter* увеличивается с северо-запада на юго-восток Беларуси, что говорит в пользу более благоприятного генетического фона по полиморфизму *LPL* в южных широтах страны.

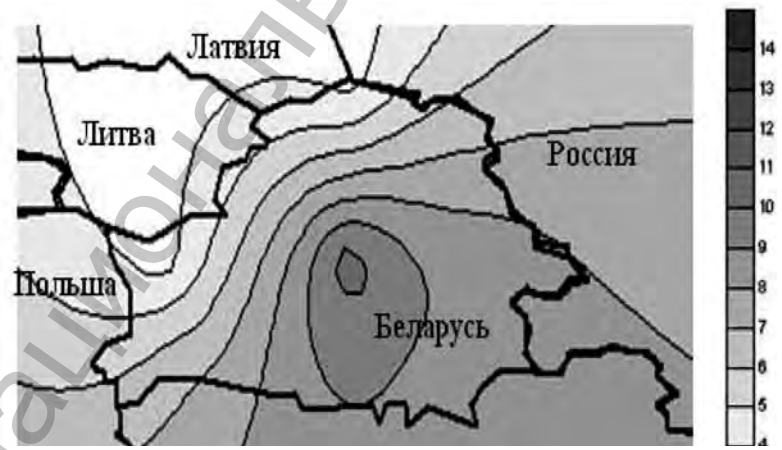


Рис. 6. Карта частоты встречаемости аллеля *447Ter* гена *LPL* у населения Беларуси. Шкала отображает численные значения частот.

Национальная академия наук Беларуси

В значительном числе работ показано, что носители мутации *Ser→Ter* имеют сниженный риск ССЗ. Wittrup и соавт. были первыми, кто провел анализ связи между некоторыми аллельными вариантами гена *LPL* и риском ишемической болезни сердца. Было подсчитано, что у носителей мутации *Ser→Ter* риск ИБС снижен на 17 % [26]. Исследования на группах больных гипертензией показали ассоциацию *447Ter* аллеля со сниженным систолическим и диастолическим давлением крови [26].

Липопротеинлипаза также играет важную роль в метаболизме холестерина в мозгу. В связи с этим в последнее время особо дискутируется роль липопротеинлипазы в патогенезе болезни Альцгеймера. Наибольшая активность *LPL* в мозгу обнаружена в гиппокампе и, как предполагают, этот фермент оказывает явный эффект на долговечность и регенерацию нейронов головного мозга. Подтверждающими фактами являются недавние работы, где показана низкая частота аллеля *447Ter* у больных БА [27, 28]. Кроме того, выявлено, что в мозгу пациентов с БА, имеющих в своем генотипе *447Ter* аллель, количество нормально функционирующих нейронов увеличено и явно редуцированы амилоидные бляшки гиппокампа по сравнению с больными БА, имеющими генотип *Ser/Ser* [27].

Следует отметить, что, кроме представленных в статье генов сердечно-сосудистой патологии, нами исследованы гены ангиотензиногена (*AGT*) и ангиотензин-превращающего фермента (*ACE*), продукты которых являются важными компонентами ренинангиотензин-альдостеро-новой системы. *I/D*-полиморфизм гена *ACE* и замена *T174M* в гене *AGT* также являются генетическими детерминантами ССЗ.

В таблице 1 представлены обобщенные данные по частотам встречаемости полиморфных аллелей пяти исследованных генов у белорусов, а также уже описанные ассоциации этих генов с патологическими фенотипами.

Таблица 1

Частоты аллелей и генотипов риска пяти генов-кандидатов ССЗ

Ген, полиморфизм	***eNOS* 4a/b-полиморфизм**	***apoE* HhaI-полиморфизм**	***LPL* Ser447Ter-полиморфизм**	***AGT* T174M-полиморфизм**	***ACE* I/D-полиморфизм**
Частоты аллелей	**18,2 % (4a)** 81,8 % (4b)	5,6 % (ε2) 86,2 % (ε3) **8,2 % (ε4)**	93,1 % (447Ser) 6,9 % (447Ter)	82,9 % (T) **17,1 % (M)**	**49,2 % (D)** 50,8 % (I)
Частоты генотипов	4,29 % (4a/4a) 27,8 % (4a/4b) 67,9 % (4b/4b)	0,5 % (ε2/ε2) 8,4 % (ε2/ε3) 74,7 % (ε3/ε3) 14,5 % (ε3/ε4) 0,1 % (ε4/ε4)	86,8 % (Ser/Ser) 12,5 % (Ser/Ter) 0,7 % (Ter/Ter)	68,0 % (TT) 29,7 % (TM) 2,3 % (MM)	24,56 % (DD) 49,39 % (ID) 26,1 % (II)
Ассоциации	Атеросклероз ИБС Инфаркт миокарда Гипертензия Инсульт мозга Сахарный диабет Диабетическая ретинопатия Гестоз Преэклампсия	Атеросклероз ИБС Инфаркт миокарда Гипертензия Инсульт мозга Болезнь Альцгеймера Болезнь Паркинсона Гистиоцитозы	Гиперлипопротеидемия I Геморрагический панкреатит Атеросклероз ИБС Гипертензия Болезнь Альцгеймера	Кардиопатия ИБС Гипертензия Инфаркт миокарда	Гипертензия Атеросклероз Инфаркт миокарда Гипертрофия левого желудочка Инсульт мозга Диабетическая нефропатия Почечная недостаточность Гестационный диабет

Примечание: жирным шрифтом выделены аллели риска ССЗ

Национальная академия наук Беларуси

Заключение

В данном исследовании показан характер распространения аллелей риска генов *eNOS, apoE, LPL* у белорусов. Наибольшая частота аллеля *4a* гена *eNOS* выявлена в центральном регионе Беларуси. Для аллеля *ε4* гена *apoE* и *447Ter* гена *LPL* показан четкий градиент увеличения частоты с северо-запада на юго-восток страны.

Исследованные полиморфизмы генов-кандидатов ССЗ не исчерпывают всего генного разнообразия и наследственной отягощенности по данной патологии, так как генетическая регуляция патогенеза ССЗ многокомпонентна и осуществляется на основе взаимодействия большого числа генов. Однако эти полиморфизмы могут быть использованы в скрининге неблагоприятных аллелей и генотипов у людей, относящихся к группам повышенного риска, что позволит избежать тяжелых осложнений ССЗ своевременно оказанной превентивной терапией.

Список использованных источников

1. Джеймисон, Д. Приоритеты в области здравоохранения / Джеймисон, Д., Бримэн Д., Мишэм Э. // Вашингтон: Изд-во «Всемирный банк». 2-е издание — 2006. — 213 с.

2. Здравоохранение в Республике Беларусь: офиц. стат. сб. за 2006 г. / М–во здравоохранения РБ, сектор методологии и анализа мед. статистики. — Минск: ГУ РНМБ, 2007. — 280 с.: табл.

3. Genetic association with human longevity at the APOE and ACE loci / F. Schachter [et al.] // Nature Genetics. — 1994. — Vol. 6. — P. 29—32.

4. Candidate genes associated with again and life expectancy / J. Stessman [et al.] // Mechanisms of ageing and development. — 2005. — Vol. 126. — P. 333—339.

5. Frequencies of allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene in patients with acute coronary syndrome in Ukrainian population / V.E. Dosenko [et al.] // Tsitol. Genet. — 2005. — Vol. 39. — P. 49—54.

6. Accociation analysis of CA repeat polymorphism of the endothelial nitric synthase gene with essential hypertension in Japanese / T. Nakayama [et al.] // Clin. Genet. — 1997. — Vol. 51. — P. 26—30.

7. The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans / W.C. Hooper [et al.] // Chest. — 1999. — Vol. 116. — P. 880—886.

8. Cine, N. Association of a polymorphism of the eNOS gene with myocardial infarction in a subgroup of Turkish MI patients / N. Cine, A.C. Hatemi, N. Erginel-Unaltuna // Clin. Genet. — 2002. — Vol. 61. — P. 66—70.

9. DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene and their association with quantitative variation in plasma high density lipoproteins and triacylglycerides / R.J. Mitchell [et al.] // Human Biology. — 1994. — № 5. — P. 239—245.

10. Davignon, J. Apolipoprotein E polymor-phism and atherosclerosis / J. Davignon, R.E. Gregg, C.F. Sing // Atheriosclerosis. — 1998. — Vol. 8. — P. 5—21.

11. Lipoprotein lipase gene variation is associated with a paternal history of premature coronary artery disease and fasting and postprandial plasma triglycerides: the European Atherosclerosis Research Study (EARS) / S.E. Humphries [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 1998. — Vol. 18. — P. 526—534.

12. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA / C.C. Mathew // Meth. Mol. Biol., Human Press. — 1984. — Vol. 2. — P. 31—34.

13. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric synthase gene / S. Nadaud [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1994. — Vol. 198. — P. 1027—1033.

14. Полиморфизм минисателлита гена эндотелиальной синтазы окиси азота: исследование в популяциях Волго-Уральского региона и анализ ассоциаций с инфарктом миокарда и эссенциальной гипертензией / О.Е. Мустафина [и др.] // Генетика. — 2001. — Т.37, № 5. — С. 668—674.

Национальная академия наук Беларуси

15. Пузырев, В.П. Генетическое разнообразие народонаселения и болезни человека / В.П. Пузырев, М.Б. Фрейдин, А.Н. Кучер — Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2007. — 320 с.

16. Фадюшина, С.В. Роль полиморфных вариантов генов, ответственных за функционирование эндотелиальной системы, в развитии гестоза / С.В. Фадюшина, Л.П. Назаренко // Сб. науч. тр. / НИИ мед. генетики ТНЦ СО РАМН. — 2007. — Вып. 8: Генетика человека и патология. Под ред. В.П. Пузырева. — С. 133.

17. Contribution of cysteine 158, the glycosylation site threonine 194, the amino- and carboxyterminal domains of apolipoprotein E in the binding to amyloid peptide beta (1-40) / Aleshkov S.B. [et al.] // Biochemistry. — 1999. — Vol. 38. — P. 8918—8925.

18. Corbo, R.M. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world: is APOE*4 a «thrifty» allele / R.M. Corbo, R. Scacchi // Ann. Hum. Genet. — 1999. — Vol. 63. — P.301—310.

19. Association of apolipoprotein E gene polymorphism with ischemic stroke involving large-vessel disease and its relation to serum lipid levels / S. Saidi [et al.]// J. Stroke Cerebrovasc. Dis. — 2007. — Vol. 16, № 4. — P. 160—166.

20. Genetic variabilitu of apolipoprotein E in a Polish population / A. Kowalska [et al.] // Hum. Biol. — 1998. — Vol. 70. — P. 1093—1099.

21. Генетическая ассоциация между аллелями гена аполипопротеина е (APOE) и различными формами болезни Альцгеймера / Г.И. Коровайцева [и др.] // Генетика. — 2001. — Т. 37, № 4. — С.529—535.

22. Apolipoprotein E genotype determines survival in the oldest old (85 years or older) who have good cognition / E.H. Corder [et al.] // Arch. Neurol. — 1996. — Vol. 53. — P. 418—422.

23. Иллариошкин, С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии / С.Н. Иллариошкин, И.А. Иванова-Смоленская, Е.Д. Маркова. — М.: Медицинское информационное агентство, 2002. — 591 с.

24. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis / H. Wittrup [et al.] // Circulation. — 1999. — Vol. 99, № 8. — P. 2901—2907.

25. Lipoprotein lipase gene variation is associated with a paternal history of premature coronary artery disease and fasting and postprandial plasma triglycerides: the European Atherosclerosis Research Study (EARS) / S.E. Humphries [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 1998. — Vol. 18. — P. 526 —534.

26. Mutations in the lipoprotein lipase gene associated with ischemic heart disease in men. The Copenhagen City Heart Study / Wittrup H. [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 1999. — Vol. 19. — P. 1535—1540.

27. Roles for lipoprotein lipase in Alzheimer's disease: an association study / Baum L. [et al.] // Microsc. Res. Tech. — 2000. — Vol. 50. — P. 291—296.

28. Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease: a genetic association study in a population aged 85 or over / Myllykangas L. [et al.] // Neurosci Lett. — 2000. — Vol. 292. — P. 195–198.

Дата поступления статьи 14 марта 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 616.8+616.74-009.86

О.А. Якуц, К.А. Моссэ, И.В. Плешко

ТОРСИОННЫЕ ДИСТОНИИ: КЛАССИФИКАЦИЯ, КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРИРОДА И ДИАГНОСТИКА

ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» МЗ РБ
Республика Беларусь, 220053, г. Минск, ул. Орловская, 66
ГУ Республиканский научно-практический центр «Неврологии и нейрохирургии» МЗ РБ
Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Скорины, 24

Введение

Торсионные дистонии (ТД) представляют собой двигательные расстройства, характеризующиеся непроизвольными, продолжительными мышечными сокращениями, приводящими к вычурным, стереотипным движениям или формированию патологических поз, проявляющимися в одной или нескольких частях тела [1].

Существует несколько общепринятых подходов к классификации дистоний:

• классификация **по клиническому проявлению** основана на возрасте манифестации заболевания и характере поражения определённых частей тела;

• **этиологическая** классификация подразделяет данную группу заболеваний на первичные дистонии, дистонии-плюс, наследственно-дегенеративные и вторичные;

• **генетическая** классификация, представленная в таблице 1, включает в себя 13 дистонических синдромов, которые дифференцируются согласно их генетической природе и локусу от DYT1 до DYT13 [2].

Таблица 1

Генетическая классификация дистоний [2]

Ген	Хромосомная локализация	Тип наследования	Характеристика заболевания, эпидемиология
DYT1	9q34	аутосомно-доминантный (АД) 30 % пенетрантность	Первичная ТД с ранним началом, начинается с конечностей, ген кодирует белок торсин А. Обнаружен эффект основателя в популяции евреев-ашкенази
DYT2	-	аутосомно-рецессивный (АР)	Встречается у цыган
DYT3	Xq13.1	Х-сцепленный (Lubag)	Начинается с головы и конечностей, характерны признаки паркинсонизма; отмечен эффект основателя на Филиппинах
DYT4	-	АД	Зарегистрирована в австралийской семье
DYT5	14q22.1	АД пенетрантность выше у девочек	Возникающая в детстве дистония-паркинсонизм, ген кодирует GTP циклогидролазу I
DYT6	8p	АД с варьирующей пенетрантностью	Дистония смешанного типа, найдена только в семье меннонитов
DYT8	2q	АД	Пароксизмальная некинезиогенная дискинезия или хорея

Национальная академия наук Беларуси

Продолжение таблицы

Ген	Хромосомная локализация	Тип наследования	Характеристика заболевания, эпидемиология
DYT9	1p	АД	Пароксизмальный хореоатетоз с эпизодической атаксией и спастичностью
DYT10	16p11.2-q12.1	АД	Пароксизмальная кинезиогенная дискинезия или хорея
DYT11	7q	АД	Миоклонус-дистония, начинается в раннем возрасте с конечности и шеи
DYT12	19q13		Быстро возникающая дистония-паркинсонизм
DYT13	1p36.13-35.32		Краниальная или цервикальная дистония, найденная в итальянской семье

Распространённость торсионной дистонии составляет в Европе 3,5 на 100 тыс. для генерализованной (DYT1) и 11,7 на 100 тыс. для фокальной (DYT6 и др) [1].

В популяции евреев-ашкенази торсионная дистония DYT1 встречается в 5-10 раз чаще, чем в любой другой популяции мира, что объясняется эффектом основателя [3]. У евреев-ашкенази наиболее частой причиной возникновения дистонии является делеция трех нуклеотидов GAG в 946-м положении 5-го экзона гена, в то время как во всех остальных популяциях она является причиной 30-50 % случаев заболевания. Анализ гаплотипов свидетельствует, что в популяцию Ашкенази мутация попала около 350-ти лет назад из Латвии или Беларуси [4]. Кроме того, она возникала неоднократно и в других популяциях мира [5, 6]. Первое поколение родственников больных ТД имеет 15 % риск возникновения заболевания, а второе поколение — около 7—8 %, с учетом неполной пенетрантности.

У носителей делеции гена DYT1 была обнаружена высоковариабельная фенотипическая экспрессия, которая вызывает не только межсемейные но и внутрисемейные различия в симптомах заболевания и степени их проявления [8].

В клинической картине доминируют гиперкинезы — насильственные движения мышц туловища, конечностей, и дистонии — непроизвольное повышение мышечного тонуса, приводящее к патологическим позам [9].

DYT1 дистония обычно манифестирует до 25 лет, однако встречаются редкие случаи, когда она начинается после 45 (обычно фокальной дистонией конечности). Может встречаться писчий спазм. Отмечаются краниальные и цервикальные участки вовлечения, но такие варианты заболевания нетипичны. По мере прогрессирования заболевания, более чем в 60 % случаев происходит его генерализация, обычно через 5 лет после возникновения. Ранняя манифестация с нижних конечностей связана с повышенным риском генерализации. Если продолжительность жизни больного не сокращается, заболевание вызывает необратимую деформацию скелета [10].

В литературе описаны также два случая необычной фенотипической экспрессия DYT1 мутации, проявляющейся миоклонус-дистонией [3].

С клинической точки зрения выделяют дофазависимую форму торсионной дистонии, характеризующуюся высокой чувствительностью к действию небольших доз леводопы, и дофанезависимую дистонию, при которой леводопа неэффективна.

Ген дофа-зависимой дистонии (GCG-1) был картирован на хромосоме 14q11-q24.3. Молекулярный анализ, проведённый в ряде семей различного этнического происхождения, позволил выявить более 20-ти различных мутаций в кодирующей области данного гена. Все мутации являются уникальными, не повторяющимися ни в одной из изученных на сегодня семей с дофа-зависимой дистонией [10].

Ген дофа-независимой дистонии (DYT1) был идентифицирован на хромосоме 9q34. Мажорной мутацией, выявленной в гене DYT1 у больных дофа-независимой формой торсионной дистонии, является делеция трех нуклеотидов GAG в 946-м положении 5-го экзона гена, ведущая к утрате одной аминокислоты в карбоксильной части белка. Высокая частота данной

Национальная академия наук Беларуси

мутации описана у больных самых различных национальностей в странах Европы и Северной Америки [12, 13, 14]. Наличие у больных разных гаплотипов по маркерам 9q34, сцепленным с мутантной хромосомой, подтверждает, что делеция возникла в результате многократных независимых мутационных событий [15]. Многократное возникновение одной и той же мутации связано с существованием в гене DYT1 тандемного 24-нуклеотидного повтора в виде двух неполностью гомологичных копий, включающих GAG-димер; делеция первого GAG-элемента данного димера приводит к существенному повышению степени гомологии соседних повторов, «провоцируя» возникновение данной мутации [16].

Анализ клинико-генетических корреляций показал, что делеция GAG в гене DYT1 обнаруживается не только у больных с типичной генерализованной формой дофа-независимой дистонии с ранним дебютом [17]. В некоторых семейных случаях данная мутация была выявлена также у больных с фокальными (писчий спазм), мультифокальными и сегментарными формами дофа-нечувствительной дистонии, а также у больных с атипичными клиническими проявлениями болезни (постуральный тремор рук, заикание вследствие дистонии оральной мускулатуры и т.п.) [15, 16]. Делеция GAG при указанных вариантах заболевания обнаруживается весьма редко, однако данный факт позволяет существенно расширить спектр клинических проявлений данной формы наследственной дистонии и должен приниматься во внимание при медико-генетическом консультировании. В ряде случаев делеция GAG в изучаемой области гена DYT1 была выявлена также у больных, не имевших семейного анамнеза [12, 13].

В гене DYT1 была идентифицирована вторая мутация — делеция 18 пар нуклеотидов в 5-ом экзоне гена. У пациента были отмечены дистония с ранним началом и миоклония [18].

Генетическая основа более распространённой фокальной дистонии с поздним началом изучена недостаточно [19]. По литературным данным, наследуются 2—15 % фокальных дистоний, в 5,9 % случаев выявлена наследственная предрасположенность. Удельный вес генетического фактора составляет 30—40 % [20]. В отдельных семьях были картированы генетические локусы, ответственные за развитие кривошеи и «дистонии промежуточного типа» — DYT 7 и 6, соответственно. Было сделано несколько попыток изучить характер сцепления «не-DYT1-дистонии» с генетическими маркерами, фланкирующими регионы DYT 6 и 7. Однако, при изучении ряда семей с характерным фенотипом сцепления обнаружено не было [20].

Материалы и методы

Отбор пациентов с клиническим диагнозом «Торсионная дистония» (включающим в себя различные формы заболевания) проводился в ГУ РНПЦ «Неврология и нейрохирургия». Были посланы запросы во все областные и районные поликлиники Республики о наличии пациентов с разными формами торсионной дистонии. После получения ответов с информацией о больных пациентам было предложено пройти клинико-генетическое обследование на базе ГУ РНПЦ «Неврология и нейрохирургия» и ГУ РНПЦ «Мать и дитя».

Биологическим материалом для молекулярно-генетического анализа служила ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови.

Для определения наличия или отсутствия делеции GAG в гене DYT1 использовалась полимеразная цепная реакция (ПЦР) и автоматический капиллярный электрофорез с полихромным лазерным сканированием.

Амплификацию проводили с праймерами, фланкирующими участок ДНК, содержащий GAG делецию. Для обеспечения флуоресценции образцов ДНК при тестировании в автоматическом анализаторе использовался меченый вариант праймера H48 с меткой 6-FAM на 3` конце. Последовательность праймеров была следующая [11]:

6419 (f) — CCTGGAATACAAACACCTA
H48 (r) — GGCTGCCAATCATGACTGTC

Был подобран оптимальный состав реакционной смеси и температурно-временные условия для ПЦР.

Реакционная смесь с конечным объёмом 20 мкл содержала 1×ПЦР буфер, 2.5мМ $MgCl_2$,

Национальная академия наук Беларуси

200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, по 5 пМ праймеров и 0,75 единиц активности полимеразы.

После денатурации образцов в течение 5 минут при 95°С следовали 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 30 с денатурации при 95°С, 30 с отжига при 53°С и 30 с синтеза при 72°С. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживались 5 мин при 72°С.

Продукты ПЦР анализировали с помощью автоматического капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 310. Из каждой реакции 0,5 мкл амплификата смешивали с 0.5 мкл маркера молекулярного веса ROX 350 (Applied Biosystems) и 8 мкл деионизированного формамида. Смесь денатурировали 2 мин при 95^0С. Электрофорез проводили при следующих параметрах: время инъекции образца в капилляр 5 с, время разделения 24 мин, напряжение 7,5 кВ, длина детектора 36 см. Для разделения использовали 4 % раствор полимера POP–4™ (Applied Biosystems). Обработку данных и определение аллелей выполняли с помощью пакета компьютерных программ GENESCAN (Applied Biosystems).

Определение аллелей проводили по наличию и положению фрагментов ДНК, зафиксированных прибором в процессе анализа. Продукт ПЦР размером 200 п.н. амплифицируется в том случае, если в анализируемом образце есть делеция, при её отсутствии фрагмент имеет размер 203 п.н.

Результаты и обсуждение

Работа по изучению генетической природы торсионной дистонии в Республике Беларусь проводится с 2007 года в рамках ОНТП «Разработать и внедрить новые медицинские мероприятия, обеспечивающие здоровое материнство и детство». За этот период нами были проанализированы литературные данные по изучаемой теме, освоены методы идентификации делеции GAG в гене DYT1, подготовлен протокол молекулярно-генетической диагностики дофа-независимой торсионной дистонии, разработана анкета для сбора информации о результатах клинико-генетического и лабораторного обследования пациентов, создан банк ДНК пациентов и членов их семей.

Молекулярно-генетический анализ на наличие делеции GAG в гене DYT1 выполнен у 42 человек. Среди них было 8 человек с генерализованной торсионной дистонией, 14 человек с различными формами фокальной дистонии (спастическая кривошея, писчий спазм и др.), 3 человека с сегментарной дистонией, 7 человек с диагнозом «торсионная дистония», 2 человека с диагнозом «экстрапирамидный синдром» и 8 фенотипически здоровых родственников.

По результатам исследования делеция была выявлена у одного пациента с генерализованной торсионной дистонией. Учитывая доминантный характер наследования, проведение молекулярно-генетической диагностики рекомендовано членам семьи, имеющим риск наличия мутации.

Это первый случай установления диагноза дофа-независимой торсионной дистонии в Беларуси с использованием ДНК-анализа. Применение молекулярно-генетических методов диагностики в дальнейшем будет способствовать уточнению симптоматической картины заболевания и улучшению, в свою очередь, его первичной клинической диагностики, а возможность раннего выявления позволит начинать своевременную профилактику и лечение.

Список использованных источников

1. De Carvalho Aguiara, P.M. Classification and genetics of dystonia / P.M. de Carvalho Aguiara, L. Ozelius // The lancet neurology. — 2002. — Vol. 1, № 5. — P. 316—3 25.

2. Tabamo, R.E. Idiopathic Torsion Dystonia [Electronic resourse] / eMedicine — 1996. — Mode of access: http://www.emedicine.com.

3. Gatto, E.M. Unusual phenotypic expression of the DYT1 mutation / E.M. Gatto, M.M.F. Pardal, F.E. Micheli. // Parcinsonism and related disorders. — 2003. — Vol. 9, № 5. — P. 277—279.

4. Иллариошкин, С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в не-

Национальная академия наук Беларуси

врологии / С.Н. Иллариошкин, И.А. Иванова-Смоленская, Е.Д. Маркова // — М: МИА, 2002.

5. Tuffery-Giraud, S. No evidence of allelic heterogeneity in the DYT1 gene of euripean patients with early onset torsion dystonia / S. Tuffery-Giraud [et al.] // J. Med. Genet. — 2001. — № 38. — P. 35—44.

6. Tagliati, M. The genetics of dystonia / M. Tagliati, M. Pourfar, S.B. Bressman // Word Federation of neurology. Demos.

7. Im. DYT1 mutation in Korean primary dystonia patients / Im, Ahn, Kim // Parcinsonism and related disorders. — 2004. — Vol. 10, № 7. — P. 421—423.

8. Лихачёв, С.А. Тактика лечения больных фокальными формами мышечной дистонии / С.А. Лихачёв // Рецепт. — 2004. — № 6. — С. 106— 111.

9. Van den Bos, M. Writer`s cramp in an Australian pedigree with DYT1 dystonia / M. Van den Bos, R. Marotta, S. Goldupetal // J. of Clin. Neuroscien. — 2004. — Vol. 11, № 5. — P. 537—539.

10. Иллариошкин, С.Н. Молекулярный анализ наследственных заболеваний нервной системы / С.Н. Иллариошкин // Весн. Рос. АМН. — 1999. — № 10. — С. 40—45.

11. Ozelius, L. The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein / L. Ozelius, J. Hewett, C. Page // Nature Genetics. — 1997. — Vol. 17.

12. Vo, J.R. DYT1 mutations amongst adult primary dystonia patients in Singapore with review of literature comparing East and West / J.R.Vo [et al.] // J.of Neurol. Science. — 2006. — № 247. — P. 35—37.

13. Lin, Dyt1 mutation in a cohort of Taiwanese primary dystonias / Lin, Chang, Chou // Park. And rel. Disord. — 2006. — Vol. 12, № 1. — P. 15—19.

14.Klein, Ch.. De novo mutations in the DYT1 gene in two non-Jewish patients with early-onset dystonia / Ch. Klein, M. Brin, D. DeLeon // Hum. Mol. Genet. — 1998. — Vol. 7, № 7. — P. 1133м1136.

15.Ikeuchi, T. Multiple founder effects in Japanese familis with primary dystonia harboring the GAG deletion in the TOR1A (DYT1) gene / T. Ikeuchi [et al.] // Neurogenetics. — 2002. — № 4. — P. 105—106.

16.Сломинский, П.А. Молекулярно-генетический анализ дофа-зависимой и дофа-независимой форм торсионной дистонии / П.А. Сломинский [и др.] // Медицинская генетика. — 2006. — Т.5, пр. 2.

17.Иллариошкин, С.Н. Молекулярная генетика наследственных дистонических синдромов / С.Н. Иллариошкин // Журнал неврологии и психиатрии. — 2000. — № 8. — P. 60—66.

18.Ikeuchi, T. Multiple founder effects in Japanese families with primary dystonia harboring the GAG deletion in the TOR1A (DYT1) gene / T. Ikeuchi [et al.] // Neurogenetics. — 2002. — № 4. — P. 105—106.

19. Gordon, N.S. Focal dystonia, with special reference to writer's cramp / N.S. Gordon // J. Clin. Pract. — 2005. — Vol.59, № 9 — P. 1088—1090.

20. Jarman, P.R. Primary torsion dystonia: the search for genes is not over / P.R. Jarman [et al.] // J. Neurol. Neurosurg Psychiatry. — 1999. — № 67. — P. 395—397.

Дата поступления статьи 17 апреля 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 616.69:612.6.05-71

Н.И. Моссэ, К.А. Моссэ

АЛЛЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ПОЛИТИМИДИНОВОГО ТРАКТА ГЕНА ТРБМ И ИХ РОЛЬ В НАРУШЕНИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ У МУЖЧИН

ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» МЗ РБ
Республики Беларусь, 220053, г. Минск, ул. Орловская, 66

Введение

Бесплодием страдают около 10—15 % супружеских пар, при этом примерно в половине случаев причиной является нарушение репродуктивной функции со стороны мужчины. Примерно у 32 % мужчин причину бесплодия установить не удается (идиопатическое бесплодие) и предполагается, что оно обусловлено генетическими или иммунологическими факторами.

К наиболее тяжелым формам мужского бесплодия относятся азооспермия и врожденное двустороннее отсутствие семявыносящих протоков (ВДОСП). Такого рода патология наблюдается у 4–5 % пациентов с нарушением репродуктивной функции [1]. Несмотря на то, что ВДОСП считается отдельной клинической нозологией, еще в 70–х годах было высказано предположение, что у некоторых мужчин оно может быть ассоциировано с очень «мягкой» формой МВ, вызванной мутациями гена трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза (ТРБМ) [2].

Причиной развития ВДОСП-фенотипа могут быть не только мутации гена ТРБМ, но и наличие определенного аллельного варианта политимидинового тракта интрона 8 данного гена. Как показано на рисунке 1, этот полиморфизм может содержать 5, 7 или 9 тимидиновых оснований (аллели 5T, 7T, 9T). Популяционная частота данных аллелей в Европе составляет в среднем 5 %, 83 % и 11 % соответственно.

Обнаружено, что в мРНК, имеющей аллель 5T, возникает альтернативный сайт сплайсинга, ведущий к появлению аномальных транскриптов гена ТРБМ, не имеющих 9 экзона. В результате продукция нормального белка может составлять менее 10 %. У мужчин с обструктивной азооспермией и ВДОСП частота 5T аллеля в 6 раз выше, чем у больных МВ или в популяции.

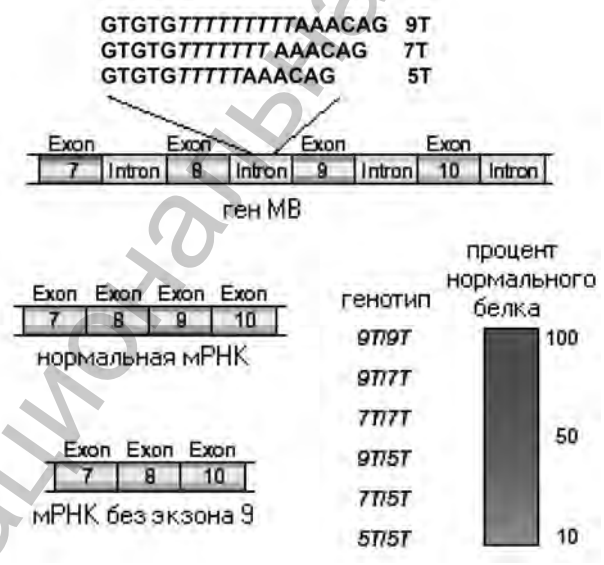


Рис. 1. Варианты аллелей полиморфизма интрона 8 гена ТРБМ и их влияние на уровень синтеза белка.

Национальная академия наук Беларуси

Необходимо отметить, что процентный вклад мутаций гена ТРБМ и 5Т аллеля в генотип пациентов с ВДОСП может значительно отличаться в разных этнических группах и популяциях. Например, во Франции, где частота МВ наиболее высока (1:2500) и соответственно большая популяционная частота мутаций, из 800 пациентов с ВДОСП у 578 (72,25 %) выявлена одна или две мутации и у 348 человек это мутация dF508 [3]. Частота 5Т аллеля в этой группе составляет 19,7 %, но чаще всего он встречается в компаунде с какой-либо мутацией, и только 7 пациентов являются гомозиготными носителями этого аллеля. Для сравнения, в Турции среди 51 обследованного с диагнозом ВДОСП найдено 4 гомозиготных носителя аллеля 5Т, что почти на порядок выше [4].

По данным различных авторов в среднем у 80 % пациентов с данной патологией могут быть выявлены мутации гена ТРБМ или 5Т аллели, что свидетельствует о том, что корреляция между генотипом и фенотипом в случае ВДОСП выражена достаточно четко [5].

Так как двустороннее отсутствие семявыносящих протоков приводит к полному отсутствию сперматозоидов в эякуляте, пациенты с такой формой бесплодия, вероятно, могут быть выявлены среди тех, кому поставлен диагноз азооспермия. Таким образом, целью данной работы было исследование аллельных вариантов политимидинового тракта интрона 8 гена ТРБМ у пациентов с азооспермией для оценки вклада генетических факторов в нарушение репродуктивной функции у мужчин и изучения возможности молекулярно-генетической диагностики ВДОСП.

Материалы и методы

Исследуемую группу составляют пациенты с азооспермией, состоящие на учете в Республиканском центре по планированию семьи и репродукции. Критерием отбора пациентов с азооспермией является диагноз, поставленный на основании общего и специального андрологического исследования, двукратного стандартного исследования спермы (менее 1 млн сперматозоидов в 1 мл) и определения уровня половых гормонов в сыворотке крови.

В качестве биологического материала использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов крови и экстрагированную из пятен крови, высушенных на специальных бланках.

Контрольная группа популяции Беларуси состояла из 150 мальчиков. В качестве образцов ДНК были использованы пятна крови, высушенные на специальных бланках. Бланки отбирались из архива скрининга новорожденных, проводимого в ГУ «РНПЦ «Мать и дитя».

Для точного гаплотипирования образцов ДНК по аллелям полиморфизма интрона 8, различающихся по длине на 2 нуклеотида, анализ выполняли с помощью автоматического капиллярного электрофореза после амплификации специфических ДНК последовательностей гена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР проводили с использованием праймеров, фланкирующих участок ДНК, содержащий тимидиновые повторы [6]:

I9D9 5’ — CCGCCGCTGTGTGTGTGTGTGTGTTTTT — FAM —3’

E9R2 5’ — GGATCCAGCAACCGCCAACA — 3’

Были подобраны оптимальный состав реакционной смеси и температурно-временные условия ПЦР, что позволило использовать для исследований минимальное количество ДНК, экстрагированной из сухих пятен крови.

Реакционная смесь с конечным объемом 20 мкл содержала 100 нг ДНК, 1хПЦР буфер, 2,5мМ MgCl2, 200 мкМ dNTP, по 5 пмоль праймеров и 0,75 ЕД полимеразы. После денатурации образцов при 95°С в течение 5 минут следовали 35 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 30 с денатурации при 95°С; 30 с отжига при 54°С и 40 с синтеза при 72°С. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживали в течение 10 мин при 72°С.

Продукты ПЦР анализировали с помощью автоматического капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Из каждой реакции 0,5 мкл амплификата смешивали с 0,5 мкл маркера молекулярного веса LIZ 500 и 11 мкл деионизи-

Национальная академия наук Беларуси

рованного формамида. Смесь денатурировали 4 мин при 95°С. Электрофорез проводили при следующих параметрах: время инъекции образца в капилляр 5 с, время разделения 28 мин, напряжение 7,5 кВ, длина детектора 36 см. Для разделения использовали 4 % раствор полимера POP-4™ (Applied Biosystems). Обработку данных выполняли с помощью компьютерной программы GENESCAN (Applied Biosystems).

Определение аллелей проводили по наличию и положению фрагментов ДНК, зафиксированных прибором в процессе анализа. Продукт ПЦР размером 204 п.н. амплифицируется в том случае, если в анализируемом образце присутствует аллель с 9 тимидиновыми основаниями (9Т). Аллели 7Т и 5Т имеют размер 202 и 200 п.н., соответственно.

Результаты и обсуждение

Анализ полиморфизма политимидинового тракта интрона 8 проводили в образцах ДНК от лиц с азооспермией и в контрольной группе. Всего распределение аллелей исследовано в 102 хромосомах от пациентов и 240 нормальных хромосомах.

В ходе проведения исследования полиморфизма идентифицированы все три аллеля, описанные в литературе, имеющие 5, 7 и 9 Т–повторов. Варианты выявленных генотипов показаны на рисунке (Рис. 2).

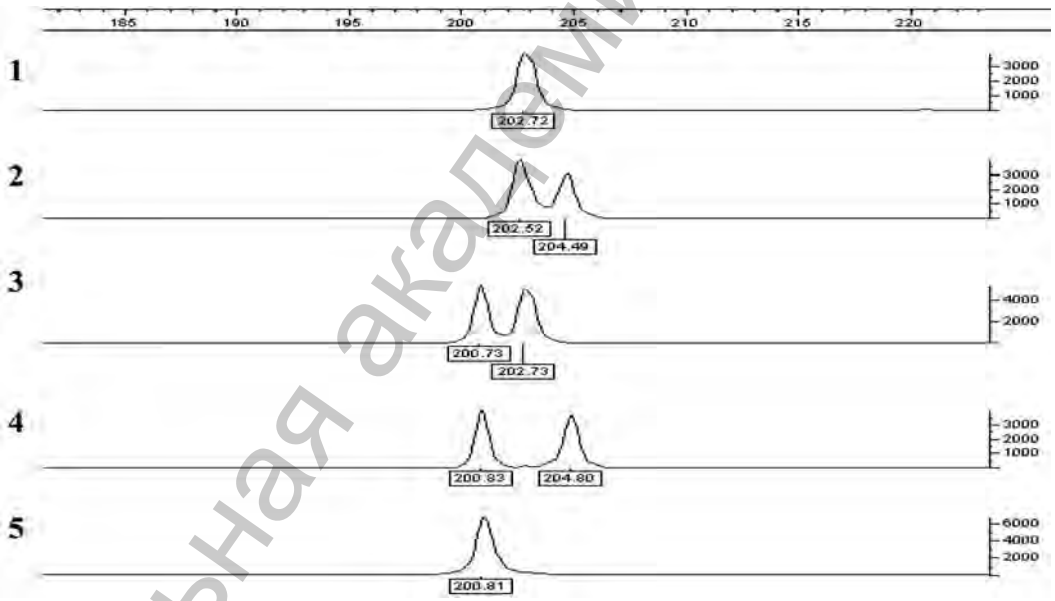


Рис. 2. Варианты генотипа по полиморфизму гена ТРБМ, идентифицированные в ходе проведения исследования: **1**– аллели 7/7, **2** — 7/9, **3** — 5/7, **4** — 5/9, **5** — 5/5.

Показано, что в контрольной группе 7Т–аллель является мажорным и встречается с частотой 84,9 %, аллель 9Т — 10,2 %, аллель 5Т — 4,8 % (Табл. 1). Гетерозиготность полиморфизма в популяции Беларуси, рассчитанная по формуле $H=1-\sum q^2$, составила 33,8 %. Полученные нами результаты хорошо согласуются с имеющимися данными для других европейских популяций. [6]

Национальная академия наук Беларуси

Таблица 1

Частоты аллелей полиморфизма интрона 8 гена ТРБМ у пациентов и в контрольной группе

Аллели	Пациенты с азооспермией		Контрольная группа	
	Абсолютное число	Процент	Абсолютное число	Процент
5T **7T** **9T**	13 80 9	12,7 78,4 8,9	10 205 25	4,2 85,4 10,4
Всего	102	100	240	100

Частота аллеля 5T, вызывающего появление аномальных транскриптов гена ТРБМ, в группе пациентов составила 12,7 % (13/102), что в три раза выше, чем в контрольной группе (χ^2=8,4, p<0,005). Кроме того, у двух пациентов с азооспермией было установлено гомозиготное носительство данного аллеля. Это является важным диагностическим признаком того, что причиной патологии у них может быть отсутствие семявыносящих протоков. По данным литературы аллель 5T выявляют у пациентов с ВДОСП в 14-20 % хромосом [3,4]. Если учитывать, что в нашу группу входили пациенты с азооспермией не уточненного генеза, то есть группа была более разнородной, полученную нами частоту можно считать достаточно высокой.

У пациентов с ВДОСП гетерозиготное носительство аллеля 5T часто ассоциировано с наличием какой-либо мутации гена ТРБМ на второй хромосоме, что и дает соответствующую клиническую картину. Исходя из этого, во всех образцах имеющих этот аллель, был проведен поиск трех наиболее часто встречающихся в Беларуси мутаций гена ТРБМ dF508, CFTRdel2,3(21kb) и 2184insA. Для определения мутаций применяли разработанную нами ранее методику мультиплексной ПЦР с последующим автоматическим капиллярным электрофорезом. По результатам анализа у одного из пациентов раннее нами было установлено гетерозиготное носительство мутации CFTRdel2,3(21kb). Ему, а также двум пациентам, являющимся гомозиготными носителями аллеля 5T, было рекомендовано пройти специальное обследование для уточнения клинического диагноза. На сегодняшний день одному из них, по результатам проведенной биопсии, выставлен диагноз аплазии семявыносящих протоков.

Таким образом, анализ аллельных вариантов политимидинового тракта интрона 8 гена ТРБМ у пациентов с азооспермией может быть не только оценкой вклада генетических факторов в нарушение репродуктивной функции у мужчин, но и являться основанием для дальнейшего обследования с целью выявления ВДОСП. Результатом исследования может стать не только разработка программы диагностики, но и определение частоты этой патологии в Беларуси, а дальнейшее исследование полиморфизма политимидинового тракта интрона 8 позволит более точно определять риск развития бесплодия у лиц, являющихся носителями аллеля 5T в генотипе.

В последние годы необходимость генетического обследования пациентов с различными формами бесплодия вышла на качественно новую ступень. У мужчин с нарушенной репродуктивной функцией появилась возможность иметь детей с помощью искусственных методов оплодотворения. Несомненно, что в семьях, в которых бесплодие имеет генетическую природу (хромосомные перестройки, микроделеции Y хромосомы, анеуплоидия и т.д.) при искусственном оплодотворении имеется высокая вероятность передачи генетического дефекта по наследству. В частности, мужчины с диагнозами азооспермия и ВДОСП имеют значительно более высокий, чем в популяции, риск рождения детей с муковисцидозом [7].

Национальная академия наук Беларуси

Заключение

Исследование гена ТРБМ может быть рекомендовано всем пациентам, вовлеченным в программу лечения бесплодия и страдающим необструктивной формой азооспермии, а также тем, у которых концентрация сперматозоидов в эякуляте составляет менее 5 млн/мл. Выявление генных дефектов объясняет причину нарушения сперматогенеза и информативно для клиницистов, так как позволяет избежать ненужного медицинского и хирургического лечения.

В связи с расширением возможностей молекулярно-генетического исследования генов, ответственных за функционирование различных звеньев репродуктивной системы, становится актуальной разработка алгоритма обследования пациентов с нарушением репродуктивной функции, а также медико-генетическое консультирование семейных пар с бесплодием.

Перед проведением процедуры экстракорпорального оплодотворения большое значение имеет генетическое обследование и консультирование супружеской пары с оценкой риска передачи потомству генетических нарушений репродуктивной функции или другой наследственной патологии. Обследование должно включать анализ кариотипа супругов и молекулярно-генетический анализ ряда генов, в том числе и ТРБМ.

Список используемых источников

1. Jequier, A.M. Congenital absence of the vasa deferentia presenting with infertility / A.M. Jequier, I.D. Ansell, N.J. Bullimore // J. Androl. — 1985. — № 6. — P. 15—19.

2. Holschlaw, D.S. Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis / D.S. Holschlaw, A.D. Perimutter, H. Jockin // J. Urol. — 1971. — Vol. 106. — P. 568—574.

3. Clausters, M. Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of vas deferens in France / M. Clausters [et. al.] // Human Mutation. — 2000. — Vol. 16. — P. 143—156.

4. Mutations of the CFTR gene in Turkish patients with congenital bilateral absence of the vas deferens / D. Dayangac [et. al.] // Human Reproduction. — 2004. — Vol. 19. — P. 1094—1100.

5. Distinct spectrum of CFTR gene mutations in congenital absence of vas deferens / T. Dork [et. al.] // Hum Genet. —1997. — Vol. 100. — P. 365—377.

6. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens / M. Chillon [et. al.] // NEJM. — 1995. — Vol. 332, № 22. — P. 1475—1479.

7. Screening for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in men included in an intracytoplasmic sperm injection programme / D. Boucher [et. al.] // Molecular Human Reproduction. —1999. — Vol. 5, № 6. — P. 587—593.

Дата поступления статьи 17 апреля 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 547.586.2:616.15:577/21 (476)

Ю.В. Цукерман, К.А. Моссэ

МУТАЦИИ ГЕНА ФАГ У БЕЛОРУССКИХ ПАЦИЕНТОВ С ФЕНИЛКЕТОНУРИЕЙ

ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» МЗ РБ
Республика Беларусь, 220053, г. Минск, ул. Орловская, 66

Введение

Фенилкетонурия (ФКУ) является одним из наиболее распространенных наследственных заболеваний (частота 1:6000 новорожденных) в популяции Беларуси. Это моногенное заболевание с рецессивным типом наследования, обусловлено дефектами гена фенилаланингидроксилазы (ФАГ), вызывающими полную или частичную инактивацию фермента.

Недостаточность ФАГ — фермента, обеспечивающего один из этапов превращения фенилаланина (ФА) в тирозин, приводит к резкому повышению содержания ФА в сыворотке крови (более 1200 мкмоль/л). Продукты метаболизма ФА оказывают токсическое воздействие на головной мозг. Считается, что основной негативный эффект оказывает фенилэтиламин, хотя допустимо, что определенная роль принадлежит дефициту ряда аминов, существующих в норме. Также существуют вариантные формы болезни, обусловленные нарушением синтеза и обмена кофактора ФАГ — тетрагидробиоптерина (BH4), которые, по данным разных авторов, составляют 2—3 % от всех выявляемых случаев ФКУ [5].

Дети с ФКУ, как правило, рождаются в срок с нормальной массой. Никаких клинических отклонений у новорожденного с ФКУ не наблюдается. Хотя развитие таких детей несколько замедленно, в первые месяцы жизни оно рассматривается как вариант нормы, и лишь к 6-8 месяцам задержка психомоторного развития становится очевидной. В дальнейшем в наибольшей степени страдает развитие речи. Также характерны повышенная возбудимость и рвоты. Примерно в четверти случаев у больных с ФКУ отмечаются судороги. Помимо задержки психического развития наблюдается ряд неврологических нарушений, может развиться микроцефалия. При проведении энцефалографии или компьютерной томографии обнаруживаются признаки атрофии коры головного мозга [6].

Важность ранней диагностики заболевания заключается в том, что существует метод лечения ФКУ, эффективность которого напрямую зависит от его своевременного начала сразу после рождения. Предотвращение или ослабление психических нарушений у больного ребенка возможно при условии раннего перевода его на специальную диету, не содержащую ФА. Диетическое лечение во многих случаях оказывается полезным и у детей старшего возраста, так как, если оно и не предотвращает развития слабоумия, то нормализует поведение и ликвидирует или ослабляет судорожный синдром.

С целью раннего выявления ФКУ в республике Беларусь уже 30 лет проводится биохимический скрининг новорожденных, позволяющий в течение первых двух недель жизни ребенка определить уровень ФА в крови и в случае необходимости начать лечение. Скрининг позволил коренным образом улучшить ситуацию с диагностикой и лечением ФКУ в нашей стране.

Вместе с тем, для профилактики заболевания наряду с программой скрининга новорожденных сегодня все шире используется пренатальная молекулярно-генетическая диагностика в семьях с высоким риском ФКУ. Пренатальная ДНК-диагностика может проводиться прямыми и непрямыми (косвенными) методами. Относительно высокая частота ФКУ в Беларуси, длительность и сложность лечения и связанные с этим трудности как для больного ребенка, так и для его родителей, а также встречающиеся случаи нарушения функций мозга после прекращения лечения указывают на исключительную важность пренатальной диагностики заболевания. Разработка и внедрение новых методов

Национальная академия наук Беларуси

молекулярного анализа гена ФАГ позволит существенно расширить возможности для ее проведения.

С практической точки зрения существует возможность единого подхода (определение мутаций методом ДНК-анализа) не только для пренатальной диагностики, но и для верификации диагноза заболевания, выявления гетерозиготного носительства, как в семьях группы риска, так и в популяции в целом.

Помимо традиционной диетотерапии в настоящее время всё более широкое применение находят альтернативные подходы, основанные на использовании фенилаланинаммиаклиазы, тетрагидробиоптерина и др. Такое лечение не снижает качество жизни больных ФКУ, так как является медикаментозным и не требует употребления исключительно специальных смесей для питания. Однако возможность использования таких препаратов напрямую зависит от генотипа больного ФКУ. Это также определяет потребность в достоверных методах идентификации как можно большего числа, обуславливающих ФКУ, мутаций гена ФАГ [7].

Ген ФАГ человека находится на 12 хромосоме на участке 12q23.21 и содержит 13 экзонов, которые составляют около 2,9 % геномной последовательности ФАГ[1–3]. В настоящее время известно более 460 мутаций в данном гене. Было установлено, что большинство изменений являются однонуклеотидными заменами, включая миссенс (61,9 %), нонсенс (5,3 %) и мутации сайта сплайсинга (11,4 %), а также нуклеотидные замены, не приводящие к замене аминокислоты (6,6 %)[8].

Для жителей Европы мажорной в гене ФАГ является мутация R408W [9]. Однако, наряду с этой мутацией, во многих европейских популяциях с относительно высокой частотой регистрируются и другие — IVS12nt1, R261Q, R252W, R158Q, P281L, IVS10nt546, I65T [2].

Вследствие того, что различные популяции мира имеют выраженную генетическую гетерогенность, изучение частоты и спектра мутаций гена ФАГ в нашей стране является необходимым для разработки наиболее эффективного алгоритма молекулярно-генетического анализа. Цель данной работы — изучить распространенность группы мутаций гена ФАГ, наиболее характерных для славянских популяций (R158Q, R261Q, Y414C, IVS11-10 g>a и IVS12nt1) у больных ФКУ в Беларуси.

Материалы и методы

Исследуемую группу составляют пациенты с ФКУ, выявленные по результатам биохимического скрининга и состоящие на учете в ГУ РНПЦ «Мать и дитя».

В качестве биологического материала использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов крови и экстрагированную из пятен крови, высушенных на специальных бланках.

Амплификацию специфических ДНК последовательностей гена ФАГ выполняли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Мутации R158Q, R261Q, Y414C, IVS11-10 g>a и IVS12nt1 выявляли по наличию или отсутствию сайта рестрикции после обработки продуктов ПЦР соответствующими эндонуклеазами и электрофоретического разделения в полиакриламидных или агарозных гелях. Условия проведения амплификации и рестрикции представлены в таблице 1.

Таблица 1

Принцип идентификации и условия определения мутаций в гене ФАГ

Мутация	Экзон	Рестриказа	Размер анализируемых фрагментов	Условия ПЦР
R158Q	5	DdeI	ПЦР-продукт — 157 п.о. После рестрикции: н/н — 137 п.о.+ 20 п.о.; н/м — 137 п.о.+ 157 п.о.+20 п.о.; м/м — 157 п.о.	Температура отжига 58°С, 35 циклов

Национальная академия наук Беларуси

Продолжение таблицы

Мутация	Экзон	Рестриказа	Размер анализируемых фрагментов	Условия ПЦР
R261Q	7	HinfI	ПЦР-продукт — 270 п.о. После рестрикции: н/н — 145 п.о.+ 123п.о. н/м — 270 п.о.+ 145 п.о.+123 п.о. м/м — 270 п.о.	Температура отжига 55°С, 35 циклов
Y414C	12	PstI	ПЦР-продукт —136 п.о. После рестрикции: н/н — 136 п.о. н/м — 136 п.о.+ 115 п.о.+21 п.о. м/м — 115 п.о.+21 п.о.	Температура отжига 55°С, 35 циклов
IVS12nt1	12	RsaI	ПЦР-продукт — 216 п.о. После рестрикции: н/н — 195 п.о.+21п.о. н/м — 216 п.о. +195 п.о. +21 п.о. м/м — 216 п.о.	Температура отжига 55°С, 35 циклов
IVS 11-10 g>a	11	DdeI	ПЦР-продукт 324 п.о. После рестрикции: н/н — 324 п.о. н/м — 324 п.о.+ 245 п.о.+79 п.о. м/м — 245 п.о.+79 п.о.	Температура отжига 55°С, 35 циклов

Результаты и обсуждение

Молекулярно-генетическая диагностика ФКУ заключается в поиске конкретных, известных мутаций в гене ФАГ, являющихся причиной развития заболевания. С 1992 года единственным генным дефектом, который определяется у пациентов с ФКУ в нашей стране, является мутация R408W. Данная мутация наиболее распространена и обнаруживается в 66,5 % мутантных хромосом (339/510) как в гетеро — так и в гомозиготном состоянии. На сегодняшний день количество семей с ФКУ в Беларуси, где выявлено гомозиготное носительство мутации R408W у пробанда, составляет не более 45 %. Одна мутация идентифицирована у 105 пациентов и ни одной мутации у 33.

Прямой метод пренатальной диагностики возможен только для тех семей, где у пробанда предварительно установлены мутации в обоих аллелях данного гена. Прямой метод обладает рядом преимуществ по сравнению с косвенным (высокая, доходящая до 100 %, точность диагностики, отсутствие необходимости обследования всей семьи), в связи с чем целесообразно выполнить поиск и определение полного спектра мутаций гена ФАГ, присутствующих в популяции Беларуси. Для гарантированного обнаружения как минимум одного мутантного аллеля у всех пациентов с ФКУ необходимо увеличить уровень выявляемости мутаций в популяции до уровня 95 %, рекомендуемых Международным консорциумом. С учетом появившихся за последние годы новых технологий и методик эта задача является вполне реальной.

Идентификация мутаций гена ФАГ также необходима для верификации диагноза, выбора тактики лечения, выявления гетерозиготного носительства.

На сегодняшний день в ГУ РНПЦ «Мать и дитя» создана база данных, включающая информацию о 549 неродственных семьях с ФКУ, собраны образцы ДНК от 255 пробандов и их родственников. Пациенты, у которых одна или обе генные мутации оставались неидентифицированными после тестирования на R408W, были отобраны для дальнейшего исследования на другие мутации, наиболее часто встречающиеся в европейских популяциях — R158Q, R261Q, Y414C, IVS11-10 g>a и IVS12nt1.

Мутация R158Q представляет собой транзицию G→A в 5-ом экзоне и значительно снижает активность ФАГ (на 90 %) [10]. В России частота встречаемости данной мутации составляет от

Национальная академия наук Беларуси

3,2 % (для Москвы и Московской области) до 4,3 % (для Санкт-Петербурга). Наиболее высокая частота встречаемости мутации R158Q наблюдается в Нидерландах — 13,3 %. В обследованной группе мутация была выявлена на 34 хромосомах, в 28 случаях в гетерозиготном состоянии и в трех случаях — в гомозиготном. На сегодняшний день она является второй по частоте в Беларуси.

Мутация R261Q, обусловлена нуклеотидной заменой G→A в 7-ом экзоне и встречается у пациентов с ФКУ практически из всех европейских стран. Самая высокая частота мутации R261Q зарегистрирована в Швейцарии (32 %) и Франции(17 %).[11] У белорусских пациентов данная мутация была выявлена в 9 хромосомах, во всех случаях в гетерозиготном состоянии.

Мутация сайта сплайсинга IVS12nt1 приводит к синтезу укороченной на 52 аминокислоты формы белка и вызывается одноосновной заменой C→A в каноническом сайте сплайсинга 12-ого экзона. Данная мутация наиболее распространена в Дании, где на ее долю приходится треть всех мутантных аллелей. В соседних странах Западной и Северной Европы ее частота составляет от 10 до 20 %, в других европейских популяциях является редкой или отсутствует. В исследованной выборке данная мутация была выявлена в 10 хромосомах, во всех случаях наблюдалось гетерозиготное носительство.

Мутации Y414C и IVS11-10 g>a были выявлены всего на двух хромосомах каждая, что свидетельствует о низкой частоте данных мутаций у белорусских пациентов.

В общей сложности анализ 5 мажорных мутаций позволил идентифицировать 57 генных дефектов у 51 больного ФКУ, что увеличило процент выявленных мутаций (с учетом R408W) до 76,7 %. У 6 пробандов были определены обе неизвестные ранее мутации, и у 34 вторая неизвестная мутация в компаунде с R408W. Таким образом, возможность прямой пренатальной диагностики появилась дополнительно для 40 семей с высоким риском ФКУ.

Заключение

Установлено, что мутации R158Q, R261Q, и IVS12nt1 являются диагностически значимыми для популяции Беларуси и их поиск у больных ФКУ является целесообразным для верификации диагноза и проведения прямой пренатальной диагностики.

Список использованных источников

1. Bartholomi, K. Genetics and biochemistry of the phenylketonuria--present state / K. Bartholomi // Hum Genet. — 1979. — Vol. 51. — P. 241.

2. Factors affecting cognitive, motor, behavioral and executive functioning in children with phenylketonuria / G.L. Arnold [et. al.] // Acta Paediatr. — 1998. — Vol. 87. — P. 565.

3. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria / A.C. Muntau [et. al.] // N Engl J. Med. — 2002. — Vol. 347. — P. 26.

4. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome / A.S. Lidsky [et. al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82. — P. 6221.

5. Tight linkage between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in phenylketonuria / A.G. DeLella [et. al.] // Nature. — 1986. — Vol. 322. — P. 799.

6. Konecki, D.S. The phenylketonuria locus: current knowledge about alleles and mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in various populations / D.S. Konecki, U. Lichter-Konecki // Hum Genet. — 1991. — Vol. 87. — P. 377.

7. Национальный Интернет-портал Республики Беларусь [электронный ресурс] — Минск, 2005. — Режим доступа: http://data.mmch.mcgill.ca/pahdb_new/images/reported_pah_mutations/jpg.

8. Recurrent mutation in the human phenylalanine hydroxylase gene / Y. Okano [et al.] // Am. J. Hum. Genet. — 1990. — Vol. 46. — P. 919.

9. Abadie, V. Molecular basis of phenylketonuria in France / V. Abadie, S. Lyonnet, D. Melle // Dev. Brain Dys. — 1993. —Vol. 6. — P. 120.

Дата поступления статьи 17 апреля 2008 г

Национальная академия наук Беларуси

УДК 612.6.05-008.9-053.2

О.Н. Гриценко

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕФЕКТОВ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА В РАЗВИТИИ ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА

ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» МЗ РБ
Республика Беларусь, 220053, г. Минск, ул. Орловская, 66

Введение

Гемолитико-уремический синдром (ГУС) является заболеванием, характеризующимся триадой основных клинических проявлений: микроангиопатическая гемолитическая анемия, тромбоцитопения и почечная недостаточность [1].

Заболевание распространено в Северной и Южной Америке (США, Аргентина), Южной Африке, Европе (Нидерланды, Финляндия, Германия, Великобритания, Беларусь, Россия и др.). Общая заболеваемость ГУС составляет примерно 0,2 — 3,4:100000 человек в год с пиком заболеваемости у детей моложе 5 лет (6,1:100000) и снижением ее у взрослых старше 50 лет (0,5:100000). Наибольшая предрасположенность к нему наблюдается у представителей европейской расы с серотипом *HLA — B40* [2].

На сегодняшний день в Республике Беларусь ГУС является одной из основных причин летальных исходов у детей с диареей и остается наиболее частой причиной возникновения острой почечной недостаточности (74,9 %) [3, 4]. У взрослых заболевание протекает более тяжело, и в большинстве случаев носит хронический или рецидивирующий характер; более чем у 50 % больных развивается хроническая почечная недостаточность или необратимые изменения центральной нервной системы, а 25 % пациентов могут умереть в острой фазе болезни [5, 6].

Материалы и методы

В работе проанализированы материалы научных статей (опубликованных в PubMed Medline), связанных с гемолитико-уремическим синдромом.

Результаты и обсуждение

По данным литературы летальность при адекватной помощи составляет 5—7 % (США, страны Западной Европы), в слаборазвитых странах —70 %, при наследственном ГУС — 70—90 %, при рецидивах ГУС — 30 %. Причина летальных исходов — поражение ЦНС, сердечная или полиорганная недостаточность. Долговременные исследования показали, что у 70—85 % пациентов почечная функция восстанавливается. Стойкость гипертонии или протеинурии через год после манифестации ГУС указывает на риск хронической почечной недостаточности. Через 5—7 лет хроническая почечная недостаточность развивается у 5 %, через 10—15 лет — еще у 10—25 % больных [4, 7].

В Беларуси летальность значительно выше, а отдаленные последствия — хуже, причиной чего является несвоевременная диагностика ГУС, позднее поступление детей в отделение диализа и неиспользование перитонеального диализа для лечения ГУС [8]. Так, смертность от ГУС в РЦ ИТ ОПН за период с 1986 по 1998 составляла 46 %, причем средний возраст детей был 1,5 года [9].

Этиология и патогенез гемолитико-уремического синдрома

ГУС неоднороден по своей этиологии. На сегодняшний день нет единой классификации гемолитико-уремического синдрома. В 90-х

Национальная академия наук Беларуси

годах выделяли ГУС, связанный с инфекцией (инфекционный ГУС) и не связанный с инфекцией, в том числе идиопатический, когда не удается установить какой-либо предрасполагающий фактор [1].

Инфекционная форма ГУС вызывается веротоксин-продуцирующей *E.coli* (в основном штаммами *O8, O25, O103, O112, O113, O145, O171* и *O174*), *Schigella dysenteriae*, микроорганизмами, секретирующими нейраминидазу (*Str. pneumoniae* и др.), ВИЧ-инфекцией.

Неинфекционная форма ГУС может быть первичной (наследственный и идиопатический ГУС), и вторичной, ассоциированной с беременностью, опухолями, аутоиммунными заболеваниями, трансплантацией органов и приемом некоторых лекарств (оральные контрацептивы, противоопухолевые препараты, антибиотики цикло-споринового ряда и др.).

Современная классификация выделяет две формы ГУС: типичную либо классическую форму гемолитико-уремического синдрома и спорадическую либо атипичную форму [1, 5, 6, 7].

У детей младше пяти лет типичная форма ГУС в 70—90 % сопровождается острой кишечной инфекцией *(ГУС-D$^+$)*, вызываемой патогенными шигатоксин-продуцирующими штаммами кишечной палочки, в частности O157:H7. Заболевание начинается с гастроинтестинального (иногда с кровавой диареей) продрома и диагностируется на шестой день после начала диареи. ГУС-D$^+$ не является доброкачественным заболеванием: 17 % пациентов требуется переливание эритроцитарной массы, 50 % нуждаются в диализе, 25 % имеют неврологические нарушения (инсульт, кома). Благодаря внедрению в практику комплексной интенсивной терапии острой почечной недостаточности, в которой гемодиализ рассматривается как временный метод протезирования функции почек, летальность снизилась с 70—90 % до 5—45 %.

Спорадический или атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС) — это редкое (около 10 % всех случаев ГУС), возможно наследственное, заболевание с неблагоприятным прогнозом, уровнем летальности достигающим 25 %, требующее протезирования функции почек у 50 % пациентов. Продром, предшествующий его развитию, не сопровождается диареей и, как правило, проявляется в виде инфекции респираторного тракта более чем у 40 % больных. Атипичный ГУС может быть ассоциирован со многими другими важными условиями и предрасполагающими факторами: бактерии *Str. pneumoniae*, вирусы (ВИЧ), лекарственные средства (химиотерапевтические, иммуносупрессивные препараты, оральные контрацептивы и наркотические вещества), системные заболевания (СКВ, склеродермия, АФС), опухоли, метилмалоновая ацидурия и гомоцистинурия. Атипичный ГУС может развиться в третьем триместре беременности и в послеродовом периоде, поскольку это заболевание ассоциировано с наличием эндотелиальных антител. Большинство случаев аГУС являются спорадическими, описаны также семейные случаи заболевания с аутосомно-доминантным (*MIM134370*) и аутосомно-рецессивным (*MIM235400*) типом наследования.

На сегодняшний день отсутствует единое мнение в отношении патогенеза гемолиза, геморрагического синдрома и поражения почек при гемолитико-уремическом синдроме. Часть авторов рассматривают ГУС как результат иммунологических процессов, связанных с реакцией антиген — антитело, другие — как проявление синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания. Согласно иммунологической концепции, при вирусных и бактериальных инфекциях образуется комплекс антиген — антитело, который, циркулируя в крови, обусловливает генерализованное поражение эндотелия капилляров, а, оседая на эндотелии капилляров клубочков и фиксируясь на базальной мембране, приводит к гломерулонефриту.

В патогенезе ГУС имеет место активация системы комплемента, как по классическому, так и по альтернативному пути. Наследственные дефекты компонентов комплемента представляются одним из основных этиологических факторов ГУС [10]. Исследования последних лет показали, что аГУС является заболеванием в 50 % случаев связанным с дефектами белков системы комплемента: фактора *H* (*CFH*), мембранного кофакторного протеина (*MCP, CD46*), фактора *I* (*FI*), фактора *B* (*FB*) и *C3* компонента системы комплемента [11,12]. Допускают, что генетические нарушения в комплементарной системе могут быть одним из предрасполагающих к развитию ГУС факторов и при приобретенных формах, в том числе, связанном с инфекцией ГУС-Д$^+$ [1].

Национальная академия наук Беларуси

Патологоанатомически в почках при ГУС выявляются три типа поражения: тромботическая микроангиопатия, двусторонний тотальный или очаговый кортикальный некроз, гломерулит со склерозированием клубочков. В других органах обнаруживаются тромбы в мелких сосудах. ГУС по своим клинико-морфологическим проявлениям сходен с синдромом Мошковица. При болезни Мошковица микротромбоз наблюдается в основном в сосудах сердечной мышцы, печени, поджелудочной железы, надпочечников, костного мозга и реже — почек, в то время как для ГУС характерно поражение сосудов почек, которое доминирует с начала заболевания [3, 4].

Генетические дефекты фактора комплемента Н

Фактор *Н* (*CFH*) — сывороточный гликопротеин, с молекулярной массой 150 кДа, синтезируемый преимущественно клетками печени, а также эндотелиальными клетками, тромбоцитами и фибробластами, является белком системы комплемента и выполняет функцию ингибитора альтернативного пути активации комплемента.

Фактор *Н* кодируется геном (*HF1*), расположенным в кластере «суперсемейства регуляторных белков системы комплемента» на хромосоме *1q32*. Каждый белок *CFH* состоит из 20 гомологичных единиц — коротких смысловых повторов (*SCRs*), состоящих из 61 аминокислотного остатка и имеющих 4 цистеиновых остатка, формирующих дисульфидные мостики *Cys*1-*Cys*3 и *Cys*2-*Cys*4. Фактор *Н* содержит три сайта связывания *С3b*: *SCR* 1 — *SCR* 4, *SCR* 6 — *SCR* 10, *SCR* 16 — *SCR* 20 и сайты связывания гепарина и сиаловых кислот в доменах *SCR* 7, *SCR* 13 и *SCR* 19-20 (Рис.1). Комплемент-регулирующая активность фактора *Н* локализована в *N*-терминальном участке, в то время как активность клеточного связывания связана с *С*-терминальным участком [7, 12, 13].

Мутации в гене *HF1* обнаруживаются у 15—30 % больных с семейными и спорадическими формами атипичного гемолитико-уремического синдрома. Описано 69 различных мутаций этого гена: 55 % составляют миссенс-мутации, 11 % — делеции, 7 % — нонсенс-мутации, 9 % — полиморфизмы, ассоциированные с заболеванием [11]. Большинство мутаций гена *HF1* встречается в гетерозиготном состоянии и обладает неполной пенетрантностью, что требует воздействия других факторов, повреждающих эндотелиальные клетки, для развития атипичного ГУС. В *С*-концевом участке фактора *Н*, доменах *SCR* 19-20, находится около 60 % всех мутаций гена *HF1* (Рис. 1) [14, 15, 16,17]. При аГУС, ассоциированном с мутациями в факторе Н, может наблюдаться снижение концентрации фактора *Н* и фактора *С3* в сыворотке крови.

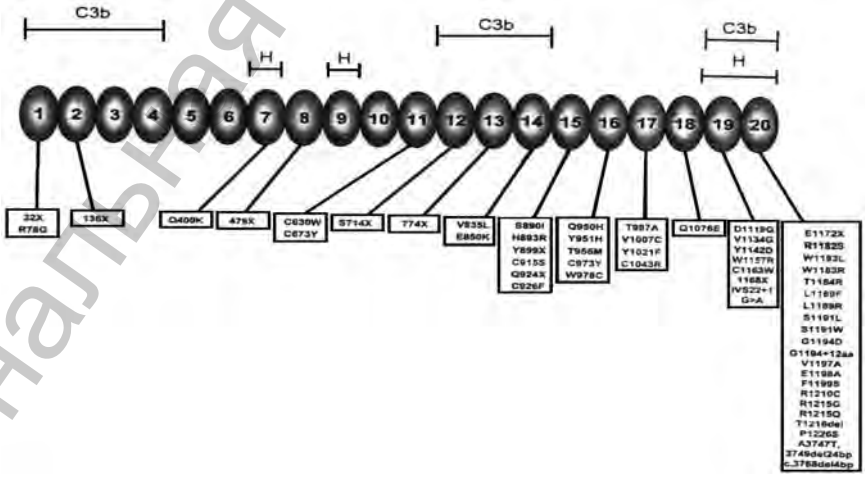


Рис. 1. Мутации гена регуляторного белка комплемента Н.

Генетические дефекты мембранного кофакторного протеина MCP (CD46).

Мембранный кофакторный белок (*MCP*, *CD46*) — это гликопротеин с молекулярной массой изоформ 51 — 58 и 59 — 68 кДа. *CD46* экспрессирован на большинстве клеток крови

Национальная академия наук Беларуси

(кроме эритроцитов), эндотелиальных клетках, фибробластах, плаценте. Полипептидная цепь этого белка состоит из 358 или 365 аминокислот. Каждый белок *MCP* состоит из 4 *SCRs* и обладает кофакторной активностью для альтернативного и классического пути комплемента. На *N*-конце имеются 4 домена, характерные для контролирующих комплемент белков, и участок богатый *Ser/Thr/Pro*. Цитоплазматический домен может иметь разную длину (Рис. 2).

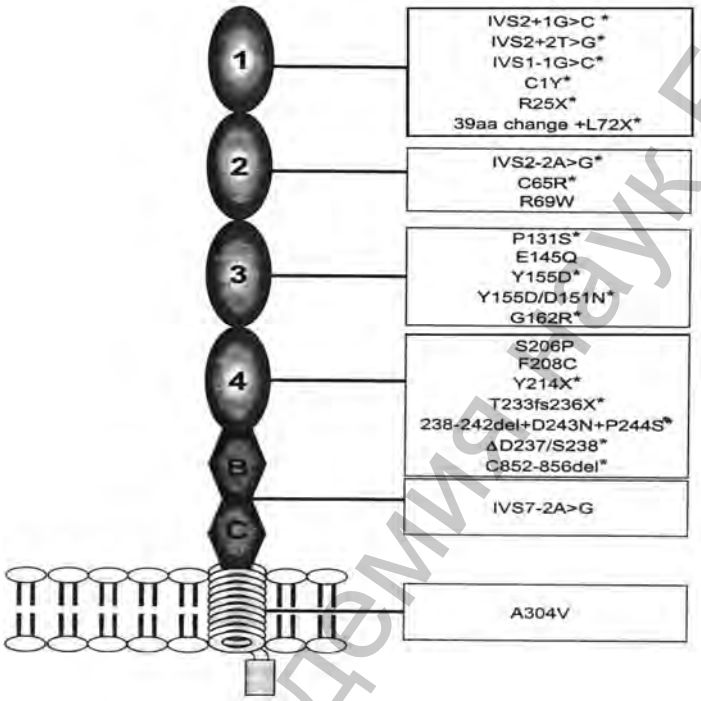


Рис. 2. Мутации гена мембранного кофакторного протеина MCP.

CD46 обладает способностью связывать C3b и C4b, тем самым создавая условия для деградации их фактором I системы комплемента, действует как кофактор расщепления C3b. Таким образом, *CD46* защищает аутологичные ткани и трофобласты от повреждений комплементом.

Ген, кодирующий мембранный кофакторный протеин, расположен в кластере «суперсемейства регуляторных белков системы комплемента» на хромосоме *1q32* и содержит 14 экзонов. Описано 25 различных мутаций этого гена, которые являются в основном миссенс-мутациями и делециями. На долю мутаций в гене *MCP* приходится 10-13 % всех случаев аГУС. Большинство мутаций затрагивают экстрацеллюлярные домены *MCP*, которые содержат область важную для регуляции комплемента [7].

Два недавних исследования, одно проводилось для французской популяции (120 пациентов) [18], другое — для итальянской (156 пациентов) [19], внесли существенный вклад в понимание дисрегуляции системы комплемента при аГУС. При скрининге мутаций пациентов с аГУС мутации *MCP* были обнаружены у 10 % французских и 13 % итальянских пациентов. 75 % мутаций *MCP* ассоциированы со снижением экспрессии *CD46* на поверхности клеток. В большинстве случаев мутации *MCP* имеются в гетерозиготном состоянии, но встречаются гомозиготные и компаундные гетерозиготные носители. Пенетрантность этих мутаций составляет 54 %. В остальных 25 % случаев, когда имела место нормальная экспрессия *MCP* на поверхности клеток, обнаруживалось снижение кофакторной активности или связывания лиганда.

Генетические дефекты фактора комплемента I. Фактор *I* — гликопротеин сыворотки крови с молекулярной массой 88 кДа, синтезируется преимущественно клетками печени. Фактор *I* — один из главных регуляторных энзимов системы комплемента, расщепляющих активные фрагменты (*C3b* и *C4b*) в присутствии их кофакторов: фактора *H* для *C3b* и *C4*-связывающего протеина для *C4b*, и мембранного кофакторного

Национальная академия наук Беларуси

протеина и рецептора комплемента 1 для обоих ферментов. Инактивация этих ферментов препятствует образованию С3 и С5 конвертазы, таким образом, фактор I инактивирует альтернативный и классический путь комплемента.

Фактор *I* комплемента является гетеродимером и состоит из двух полипептидных цепей с молекулярными весами 50 и 38кДа, соединенных дисульфидной связью. В тяжелой цепи расположены четыре домена: домен, который обнаружен только в факторе I, домен скавенджер-рецептора (*CD5*), два домена для рецепторов липопротеинов низкой плотности *LDLr*-1 и *LDLr*-2. В легкой цепи расположен домен сериновой протеазы (Рис. 3). Фактор *I* (*IF*) синтезируется как единая полипептидная цепь, которая впоследствии проходит внутриклеточный протеолитический процесс.

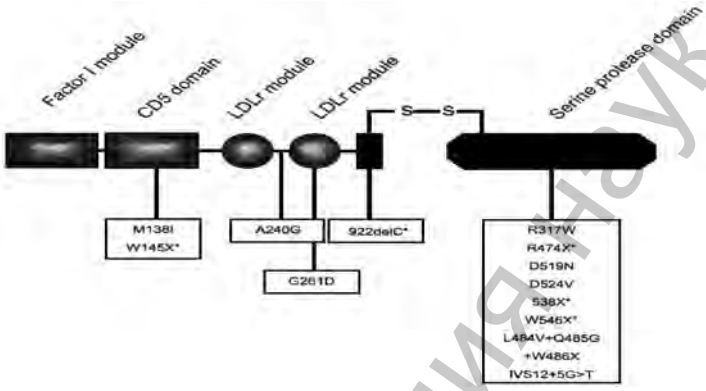


Рис. 3. Мутации гена фактора комплемента I.

Ген фактора *I* расположен на хромосоме *4q25*. Описано 12 различных мутаций этого гена, которые являются в основном миссенс-мутациями. Дефекты фактора *I* комплемента наблюдаются только при спорадических формах аГУС, они реже служат причиной развития аГУС, чем мутации в факторе *H* и *MCP*. Частота носительства этих мутаций колеблется от 3 до 12 %. Около 40-45 % мутаций гена *IF* приводят к снижению концентрации сывороточного фактора *I* [7, 21].

Клинически фенотип *MCP*-ассоциированного атипичного ГУС отличается от фенотипов, ассоциированных с факторами *I* и *H*: у этих пациентов реже развивается хроническая почечная недостаточность, а исход почечной трансплантации более благоприятный. У 86 % пациентов с *MCP*-ассоциированным аГУС итальянской когорты отмечалась нормальная функция почек по сравнению с 23 % и 33 % пациентами с аГУС, ассоциированным с факторами *H* и *I*. При фенотипе, ассоциированном с факторами *I* и *H*, исход почечной трансплантации неблагоприятен, риск отторжения трансплантата в течение первых двух лет составляет более 80 %. Поскольку факторы *I* и *H* синтезируются в печени, пациентам с фенотипом, ассоциированным с фактором *I* и *H*, рекомендуется комбинированная трансплантация почки и печени.

Заключение

Таким образом, мутации в генах CFH, MCP, IF меняют структуру и функцию белков и играют роль предрасполагающих факторов в развитии ГУС. Некоторые пациенты с аГУС могут иметь мутации в нескольких генах регуляторных белков системы комплемента, что определяет характер течения и прогноз заболевания. Всем пациентам с хронической почечной недостаточностью, нуждающимся в пересадке почки, необходимо провести скрининг мутаций фактора *H*, фактора *I* и *MCP*. Пациентам, у которых выявлены мутации фактора *H*, фактора *I* и *MCP* рекомендуется комбинированная трансплантация почки и печени.

Национальная академия наук Беларуси

Список использованных источников

1. Neild, G.D. Hemolytic uremic syndrome/ trombotic thrombocytopenic purpura: Pathophysiology and treatment. / G.D. Neild // Kidney international. — 1998. — Vol. 53, Suppl.64. — P. 45—49.

2. Борисов, Т.П. Гемолитико-уремический синдром у детей. / Т.П. Борисов // Medicus amicus. — 2006. — № 6.

3. Миронов, Л.Л. Этиология острой почечной недостаточности // Материалы международной конференции, посвященной 100-летию Гомельской городской больницы скорой помощи «Неотложная медицина». — Гомель, 2003. — С. 128—129.

4. Миронов, Л.Л. Гемолитико-уремический синдром: диагностика и клинико-морфологическая картина / Л.Л. Миронов, И.И. Канус // Медицинские новости. — 2004. — № 5. — С. 32—36.

5. Hypocomplementemia discloses genetic predisposion to hemolytic uremic syndrome and trombotic thrombocytopenic purpura: role of factor H abnormalities / M. Noris [et al.] // Jornal of the American society of nephrology. — 1998. — Vol.10. — P. 281—293.

6. Remuzzi, G. The hemolytic uremic syndromes / G.Remuzzi, J. Caprioli // Curr. Opin. Crit. Care. — 2005. — Vol. 11, №5. — P. 487–92.

7. Kavanagh, D. Atypical haemolitic uremic syndrome. / D. Kavanagh, Goodship T.H.J., Richards A. // British Medical Bulletin. — 2006. — № 77–78. — P. 5–22.

8. Вильчук, К.У. Клинико-лабораторная характеристика гемолитико-уремического синдрома у детей / К.У. Вильчук, Н.А. Максимович, Богомолов, А.Н. Особенности гемолитико-уремического синдрома у детей / А.Н. Богомолов, Т.Л. Вечер // Материалы конференции «Актуальные проблемы современной медицины 2000». — 2000. — С. 8.

9. Warwicker, P. Genetic Studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome / P. Warwicker // Kidney international. — 1998. — Vol. 53. — P. 836–844.

10. aHUS Mutation Database [Electronic resource] / 2004. — Mode of access: http://www.FH-HUS.org

11. Screening for complement system abnormalities in patients with atypical hemolytic uremic syndrome / D. Kavanagh [et al.] // Clinical Journal of American Society of Nephrology. — 2007. — Vol. 2. — P. 591 — 596.

12. Atkinson, J.P. Complement factor H and the hemolytic uremic syndrome / J.P. Atkinson, T.H.J. Goodship // Journal of Experimental Medicine. — 2007. — Vol. 204, № 6.

13. Haemolytic uraemic syndrome and mutations of the factor H gene: a registry-based study of German speaking countries / H. P. H. Neumann [et al.] // Journal of Medical Genetics. — 2003. — Vol. 40. — P. 676—681.

14. Structural and functional characterization of factor H mutations associated with hemolytic uremic syndrome / P. Sбnchez-Corral [et al.] // American Journal of Human Genetics. — 2002. — Vol. 71. — P. 1285—1295.

15. Human complement factor H deficiency associated with hemolytic uremic syndrome / N. Rougier [et al.] // Journal of the American society of Nephrology. — 1998. — Vol. 9. — P. 2318—2326.

16. Structure of complement factor H carboxyl-terminus reveals molecular basis of atypical haemolytic uremi syndrome / T. Jokiranta [et al.] // European Molecular Biology organization Journal. — 2006. — № 25. — P. 1784—1794.

17. Fremeaux-Bacci, V. Genetic and functional analyses of membrane cofactor protein (CD46) mutations in atypical haemolytic uremic syndrome / V. Fremeaux-Bacci [et al.] // J. Am. Soc. Nephrol. — 2006. — № 17. — P. 2017—2025.

18. Genetics of HUS: The impact of MCP, CFH and IF mutations on clinical presentation, response to treatmцent, and outcome / J. Caprioli [et al.] // Blood. — 2006. — № 15. — P. 1267—1279.

19. Goodship Mutations in complement factor I predispose development of atypical hemolytic syndrome / D. Kavanagh [et al.] // Journal of the American Society of Nephrology. — 2005. — № 16. — P. 2150—2155.

Дата поступления статьи 17 марта 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК (57.017.6+576.385.5):575.155

Я.И. Шейко, О.В. Квитко, И.И. Конева, С.Е. Дромашко

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ АНОМАЛЬНЫХ МИТОЗОВ В ПРОЦЕССЕ РАКОВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Современный уровень познания процессов старения и раковой трансформации клеток в значительной степени достигнут благодаря открытию молекулярно-генетических событий, происходящих в клетках.

Прогресс в изучении раковой трансформации клеток в большой степени зависит от совершенствования экспериментальных моделей. Исследования в области молекулярной генетики соматических клеток в основном выполняются на большой совокупности клеток в один из моментов роста клеточной популяции. Однако данный подход не позволяет изучать всю последовательность связанных с раковой трансформацией генетических изменений, начиная с их возникновения в отдельных клетках и заканчивая распространением этих изменний в клеточной популяции. Для устранения этого пробела необходимо непрерывное изучение клеточных популяций на уровне отдельных клеток, а также их потомств на протяжении многих поколений. С этой целью нами был разработан метод анализа отдельных клеток в клеточных клонах на основе продолжительной компьютерной видеосъемки живых клеточных культур. В качестве объектов исследования использовались клетки человека и мыши. Человек и мышь — виды млекопитающих, резко контрастные по продолжительности жизни, а также частоте возникновения онкологических заболеваний, которая у грызунов на несколько порядков выше, чем у человека [1]. Сравнение изменений фенотипа на уровне отдельных клеток и их клонов у человека и мыши позволяет получать новые данные о генетических процессах, ведущих к старению и раковой трансформации.

Материалы и методы

Для приготовления культур фибробластов человека и мыши использовали кожно-мышечную ткань 8—12-недельных эмбрионов человека и 12—14-суточных эмбрионов мыши линии Af. Измельченную ткань дезагрегировали 0,25 %-ным раствором трипсина при 37°С в течение 30 мин. После удаления трипсина осадок суспендировали в ростовой среде, включающей 90 % среды Игла и 10 % эмбриональной сыворотки телят с добавлением антибиотиков. Суспензию пропускали через капроновый фильтр (ячейка 0,3 х 0,3 мм). Концентрацию единичных фибробластов подсчитывали в камере Горяева. Агрегаты клеток и клетки, отличающиеся от фибробластов, при подсчете не учитывали. Иммортализированная (постоянная) клеточная линия была выделена нами в процессе роста первичной культуры фибробластов, полученных из 12—14-суточных эмбрионов мышей Af. Клетки высевали в сосуды Карреля при посевной плотности 100—300 тысяч на 1 см^2 ростовой поверхности и культивировали в ростовой среде 5—7 дней. После образования монослоя клетки пересевали в течение ряда пассажей до использования в дальнейших экспериментах. Для выполнения экспериментов по компьютерной видеомикроскопии клеточные культуры трипсинизировали, и клетки высевали в ростовой среде (80 % среды Игла, 10 % эмбриональной сыворотки телят, 10 % пуповинной сыворотки человека с добавлением антибиотиков) при низкой плотности (500 клеток на 1 см^2). После добавления

Национальная академия наук Беларуси

CO_2 (5 % объема) с помощью шприца сосуды Карреля закупоривали резиновыми пробками и культивировали клетки в термостатируемой (37^0C) камере инвертированного микроскопа. Для анализа живых клеточных культур нами был собран компьютерный видеокомплекс, включающий инвертированный микроскоп с термокамерой и цветную видеокамеру, подключенную к компьютеру. Для компьютерной видеосъемки сосуд Карреля с клетками помещали в термокамеру (37^0C) инвертированного микроскопа. С помощью визуального просмотра выбирали ячейку (1x1 мм) стеклянного вкладыша или участок культуры на дне сосуда Карреля и выполняли автоматическое компьютерное фотографирование клеток с частотой 1 кадр в минуту.

Результаты и обсуждение

В процессе культивирования культуры клеток мыши с гораздо большей вероятностью, по сравнению с клетками человека, могут спонтанно иммортализироваться. Этот факт согласуется с данными о значительно более высокой частоте возникновения онкологических заболеваний у грызунов. В наших исследованиях, в процессе культивирования эмбриональных фибробластов мыши, культуры этих клеток, в отличие от культур фибробластов человека, неоднократно спонтанно иммортализировались.

Одной из причин ракового перерождения клеток, по-видимому, являются аномалии протекания митотического деления клеток. Об этом свидетельствуют полученные нами данные.

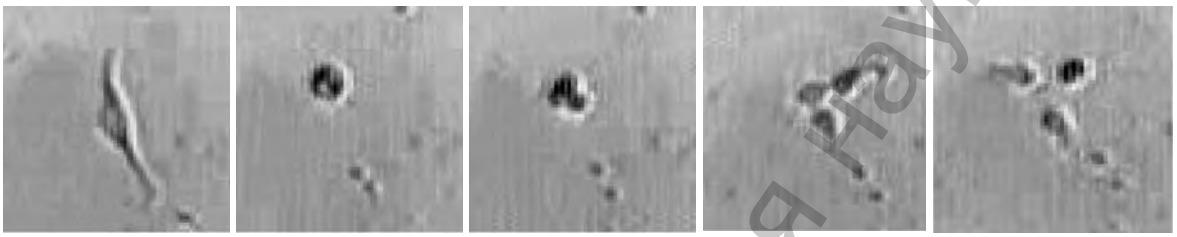
Так, нами было установлено, что крупные фибробласты человека не делятся, в отличие от крупных фибробластов мыши. На рисунке 1 представлены данные по митотическим делениям клеток человека и мыши в двух группах размером до 2300 мкм^2 и более 2300 мкм^2. У фибробластов человека было отмечено деление только тех клеток, чья максимальная наблюдаемая площадь не превышала 2300 мкм^2, а в культуре мышиных фибробластов делились и самые крупные клетки (до 8000 мкм^2). Как видно из рисунка 2, вероятность митотического деления крупных клеток мыши намного выше по сравнению с крупными клетками человека (до 14400 мкм^2). Среди больших клеток чаще встречаются постаревшие и полиплоидные клетки, которые при делении с большей вероятностью могут продуцировать дисфункциональные или трансформированные дочерние клетки. У человека, по-видимому, имеется более надежная система блокировки митозов, которая препятствует делению крупных и/или дисфункциональных клеток. Поэтому данное яркое отличие в клеточных делениях человека и мыши может являться одной из причин значительного отличия в частоте иммортализации, а также раковой трансформации клеток данных видов млекопитающих.

Рис. 1. Митотическая активность фибробластов человека и мыши в группах клеток с площадью от 150 до 2300 мкм^2 и более 2300 мкм^2.

Цифры в столбцах показывают общее количество клеток в данной группе.

Национальная академия наук Беларуси

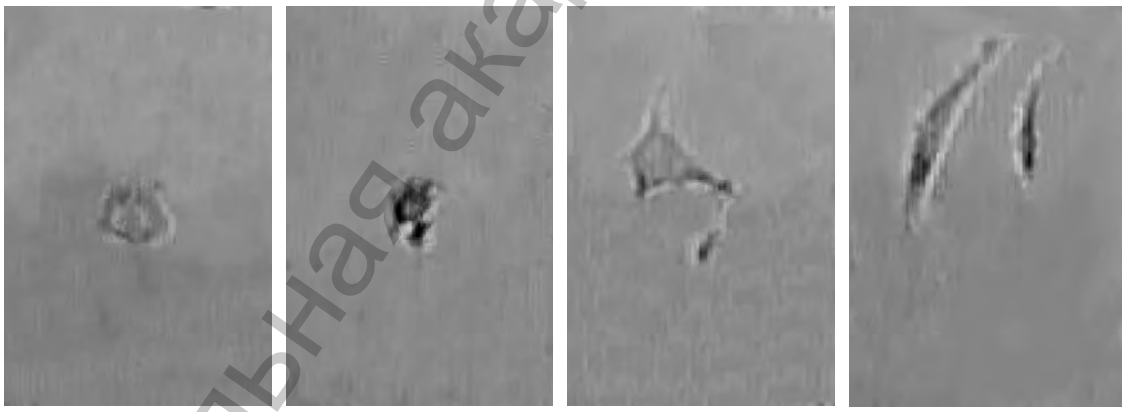
Для изучения вопроса об участии аномальных митозов, которые могли бы генерировать генетически несбалансированные клетки, в процессе раковой трансформации, важно определить, способны ли дочерние клетки, возникшие в результате аномальных митозов, не только делиться, но и становиться родоначальницами активно пролиферирующих клеточных клонов. В связи с этим мы изучали возможность образования активно пролиферирующих клеток путем аномальных митотических делений в иммортализированной культуре. В данной культуре достаточно часто наблюдались трехполюсные митозы с образованием трех дочерних клеток (Рис. 2), а также асимметричные биполярные митозы (Рис. 3). Так как деление крупных клеток обычно не сопровождается видимыми аномалиями, то в данной части работы большее внимание уделялось четко выраженным аномальным митозам, а не размерам материнских клеток.



а) 0ч 0м **б) 3ч 12м** **в) 6ч 24м** **г) 6ч 30м** **д) 6ч 50м**

100 мкм

Рис. 2. Митотическое деление клетки иммортализированной линии из эмбриона мыши с образованием трех дочерних клеток. Материнская клетка (а) принимает шаровидную форму (б) и делится на три дочерние клетки (в—д), каждая из которых явилась родоначальницей клеточной субпопуляции, возникшей в результате последовательных симметричных митозов.



а) 0ч 00м **б) 4ч 00м** **в) 10ч 00м** **г) 12ч 00м**

100 мкм

Рис. 3. Асимметричное митотическое деление крупной клетки иммортализированной культуры из эмбриона мыши. Материнская клетка (а) делится на две дочерние клетки различного размера (б—г).

В результате анализа видеозаписей была составлена клеточная генеалогия (Рис. 4)

Национальная академия наук Беларуси

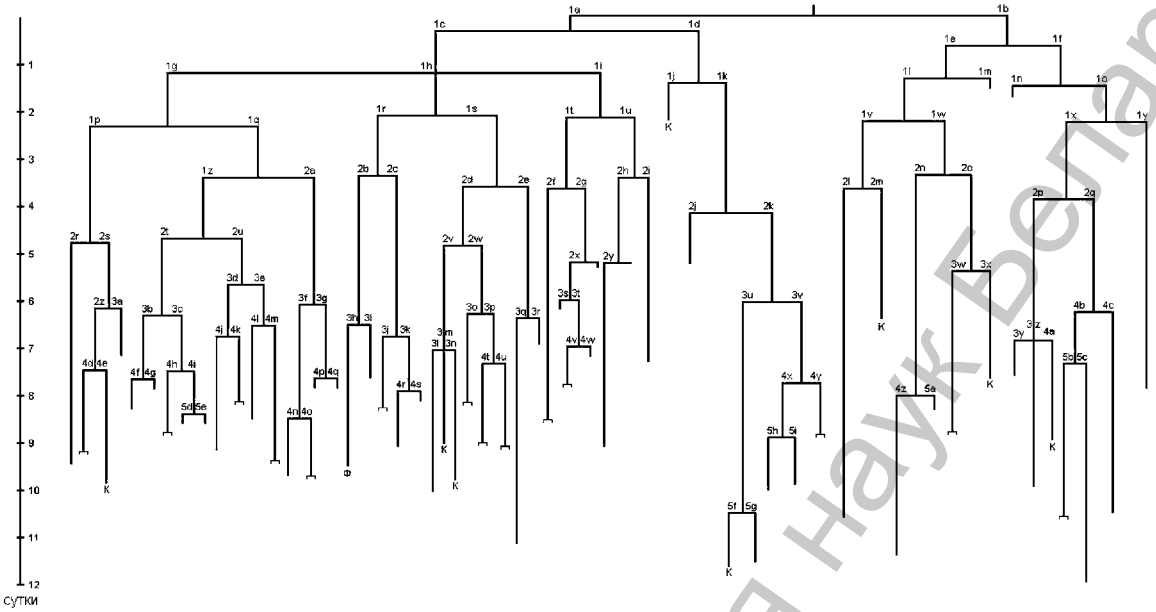


Рис. 4. Клеточная генеалогия иммортализированной линии из эмбриона мыши.

Длины вертикальных отрезков соответствуют времени между митозами (разветвления) или между митозом и прекращением наблюдения (прерванные окончания отрезков).

К — гибель клетки путем конденсации.

Ф — гибель клетки путем распада на несколько фрагментов.

Среди 71 митоза во всей клеточной родословной было обнаружено 3 трехполюсных митоза (соответствующие материнские клетки 1c, 2v и 2p), а также 7 асимметричных биполярных митозов (материнские клетки 1p, 2q, 2s, 2w, 3b, 3d и 3t).

Клетки, возникшие в результате аномальных митозов, в ряде случаев активно делились. Так, все три клетки (1g, 1h и 1i), возникшие при тройном делении клетки 1c, явились родоначальницами активно делящихся субклонов. При этом, потомство образовавшихся трех дочерних клеток обладало более высокой пролиферативной способностью по сравнению с остальными частями родословной. При асимметричных биполярных митозах, подобно трехполюсным, также нередко продуцировались жизнеспособные клоногенные клетки.

Таким образом, в иммортализированной линии в результате трехполюсных и асимметричных биполярных митозов генерируются клоногенные клетки. Это указывает на возможность участия аномальных митозов в процессе трансформации клеток. При аномальных митозах, приводящих к нарушению хромосомного состава, может происходить амплификация онкогенов и потеря гетерозиготности генов — супрессоров клеточного деления, что ведет к образованию трансформированных клеток [2].

Заключение

Получены данные, свидетельствующие о более надежной системе ингибирования делений крупных клеток в популяциях нормальных (стареющих) фибробластов человека по сравнению с мышью. В культурах иммортальной клеточной линии из эмбриона мыши аномальные митотические деления (трехполюсные и асимметричные биполярные митозы) не приводят к замедлению клональной экспансии. Поэтому нарушения митотического деления могут вносить вклад в поддержание иммортализированного со-

Национальная академия наук Беларуси

стояния клеточных популяций посредством генерации хромосомной нестабильности. Полученные данные свидетельствует о целесообразности поиска антираковых препаратов, нормализующих процессы деления, а также препятствующих пролиферации либо индуцирующих апоптоз аномально делящихся клеток и их потомков.

Список использованных источников

1. Simons, J.W. Genetic, epigenetic, dysgenetic, and non-genetic mechanisms in tumorigenesis / J.W. Simons // Critical Reviews in Oncogenesis. — 1995. — Vol. 6, № 3/6. — P. 261—273.

2. Rajagopolan, H. Aneuploidy and cancer / H. Rajagopolan, C. Lengauer // Nature. — 2004. — Vol. 432. — P. 338—341.

Дата поступления статьи 27 марта 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 614.976 : 616-008

С.Б. Мельнов, Ю.В. Малиновская

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ГЕНОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ПРИ НИЗКОДОЗОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ У ЧЕЛОВЕКА

УО «Международный государственный экологический университет имени А.Д. Сахарова»
Республика Беларусь, 220009, г. Минск, ул. Долгобродская, 23

Введение

Промышленная революция, начавшаяся несколько веков назад, из-за неконтролируемой эксплуатации природных ресурсов и быстрого развития различных видов промышленности, положила начало глобальной атаке человечества на окружающую среду. На сегодняшний день вся наша жизнедеятельность связана с химическими и физическими антропогенными веществами и факторами. Непрерывное расширение применения ионизирующих излучений неизбежно приводит к увеличению дозовых нагрузок для значительных групп людей, в промышленности, медицине, науке. Особо значимые эффекты имели место в случае техногенных катастроф, таких, как авария на ЧАЭС, в результате которой, значительная часть территории нашей Республики оказалась загрязненной радиоактивными веществами, а население подверглось и продолжает подвергаться дополнительному радиационному воздействию. Таким образом, можно констатировать, что человечество постоянно находится в контакте с комплексом химических и физических мутагенов, сочетанный эффект которых не изучен и может быть опасен для человека. Таким образом, изучение эффектов низкодозовых хронических и острых антропогенных воздействий должно в настоящее время стать одним из магистральных направлений науки.

В настоящей работе мы попытаемся дать анализ результатов исследования влияния низкодозовых радиационных воздействий на геном соматических клеток человека, а также интерпретировать эти данные с учетом открытых фактов и закономерностей.

Материалы и методы

Общепризнанно, что ликвидаторы 1986-1987 гг. представляют собой наиболее пострадавшую группу населения, которая получила максимальные дозовые нагрузки [1], а, учитывая тот факт, что отдаленные последствия радиационного воздействия опосредуются генетическим аппаратом, особое значение приобретает генетический мониторинг пострадавшего населения. Достаточно эффективным, наиболее разработанным и широко используемым подходом при оценке общего генетического гомеостаза соматических клеток является цитогенетический анализ. Точность данного метода в существенной степени зависит от временного интервала между моментом воздействия и обследования, а также от типа облучения и количества метафаз в анализе. Цитогенетический анализ основан на использовании непрямого метода получения клеточной популяции с высокой митотической активностью, связанного с предварительным культивированием выделенных из организма клеток в питательной среде *in vitro*. Наиболее общепризнанным объектом являются лимфоциты периферической крови. Это обусловлено целым рядом причин: доступностью материала, легкостью культивирования и приготовления препаратов, совпадением эффектов *in vivo* и *in vitro*.

Цитогенетические препараты готовили по стандартной методике. От каждого пациента

Национальная академия наук Беларуси

анализировали не менее 100 метафазных пластинок (в зависимости от количества и качества препаратов). Анализ проводился под иммерсионным объективом бинокулярного микроскопа (×1500). Результаты анализа фиксировались в стандартном бланке. Отмеченные аберрации схематически зарисовывались с обязательной фиксацией координат в каждом конкретном случае. Учитывались все типы аберраций, распознаваемые без кариотипирования: парные фрагменты (ПФ), кольца ацентрические (КА), кольцевые хромосомы (КХ), дицентрические хромосомы (ДХ), атипичные хромосомы (АХ), одиночные фрагменты. Также подсчитывалось количество полиплоидных клеток.

Оценка уровня кластогенных факторов в сыворотке крови проводилась с использованием микроядерного теста на тест-культуре иммортализованных кератоноцитов.

Объект исследований – сыворотка крови ликвидаторов1986-1987 гг. (7 пациентов) и группы работников Полесского государственного радиационного заповедника (ПГРЗ) (6 пациентов); контрольная группа – 11 лиц, не имевших контакта с дополнительными радиационными воздействиями и соответствующие пациентам основной группы в возрастно-половом аспекте. Кроме того, были обследованы пациенты, страдающие гепатитом С и циррозом печени -11 человек, а также 3 пациента с симптомами активной фазы острого респираторного заболевания.

Подсчет микроядер проводился на инвертированном микроскопе при увеличении ×400. Результаты подсчета (в анализ брали 1000 биядерных клеток/флакон) регистрировали с учетом количества микроядер на одну биядерную клетку.

Результаты и обсуждения

Анализ полученных нами в течение последних 18 лет данных свидетельствует о том, что даже в отдаленный период после мутагенного воздействия в цитогенетическом статусе соматических клеток ликвидаторов сохраняются выраженные изменения.

Характер этих изменений носит однонаправленный характер – отмечен рост частоты практически всех типов хромосомных аберраций. Что же касается отдельных классов аберраций, то динамика их численности существенно варьирует.

Графический анализ данных, представленных на рис. 1, свидетельствует о неравномерном характере изменения частоты одиночных фрагментов (ОФ) в лимфоцитах периферической крови ликвидаторов со временем, хотя общая тенденция представляется очевидной.

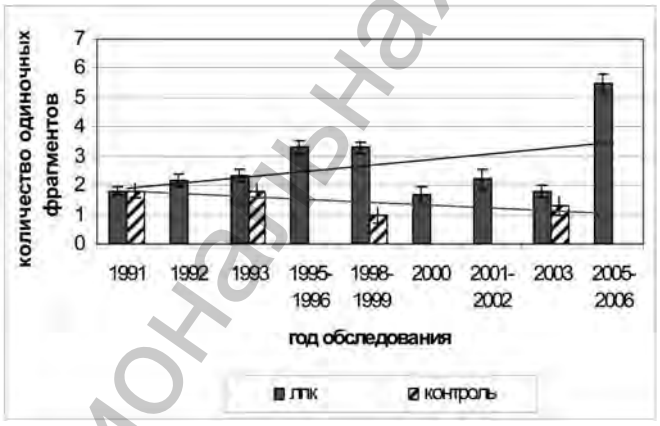


Рис. 1. Динамика одиночных фрагментов у ликвидаторов 1986—1987 гг.

Здесь необходимо отметить, что этот тип аберраций неспецифичен и является одним из основных признаков формирующегося состояния геномной нестабильности.

Схожая тенденция наблюдается и в отношении парных фрагментов.

Национальная академия наук Беларуси

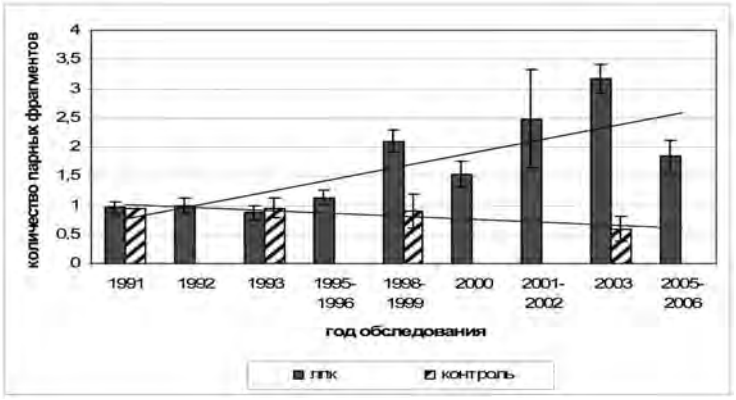


Рис. 2. Динамика парных фрагментов у ликвидаторов 1986—1987 гг.

Данные графического анализа, представленные на рис. 2, наглядно подтверждают эту тенденцию, однако, характер флуктуации этого параметра существенно отличается от вариаций частоты ОФ, что свидетельствует о независимости динамических процессов по указанным параметрам.

Одним из наиболее значимых критериев, характеризующих состояние генома и отражающих степень мутагенного влияния на организм, является нагруженность клеток аберрациями (количество аберраций на одну аберрантную клетку, рис. 3).

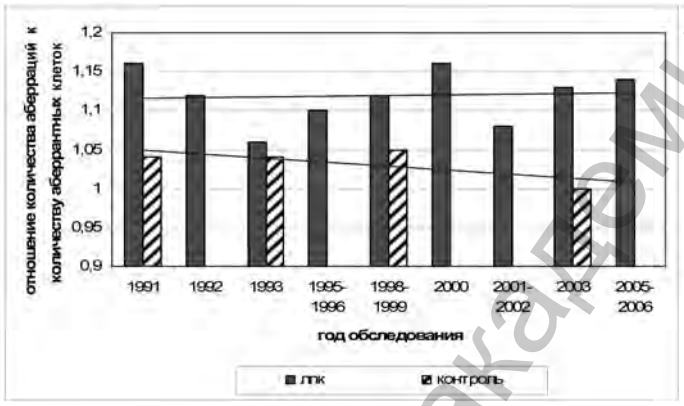


Рис. 3. Нагруженность аберрациями соматических клеток у ликвидаторов 1986—1987 гг.

Анализ представленных на рис. 3 данных свидетельствует о сложной динамике этого показателя: так, если в первые годы явно прослеживалась тенденция к снижению количества мультиаберрантных клеток, то в дальнейшем этот показатель начинает нарастать и сохраняется на достаточно высоком уровне вплоть до 2006 г.

Биологическое значение этого феномена в настоящий момент не ясно и нуждается в дальнейшем изучении.

У обследованных отмечался также достоверный рост частоты полиплоидных клеток (рис. 4).

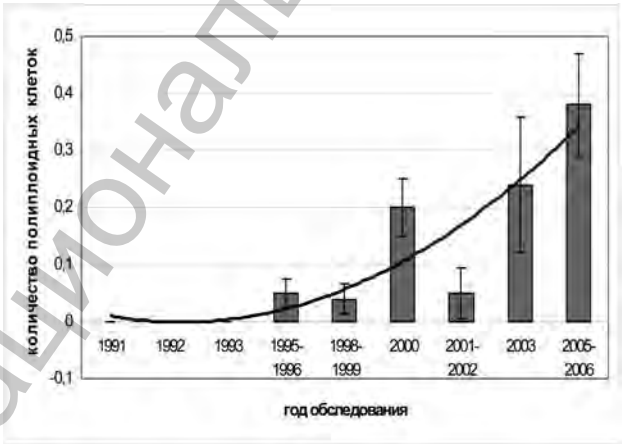


Рис. 4. Динамика полиплоидных клеток у ликвидаторов 1986—1987 гг.

Национальная академия наук Беларуси

Причины этого явления также требуют детального анализа. И в настоящее время необъяснимы. При этом, уместно отметить, что несколько раньше (1992-1993) аналогичные данные были получены и в отношении профессионалов — атомщиков, принимавших участие в ликвидационных работах в Чернобыле [2].

Особый интерес представляют данные, касающиеся динамики маркерных аберраций радиационного воздействия, к числу которых относятся в первую очередь дицентрические и кольцевые хромосомы (ДХ и КХ).

У обследованных нами ликвидаторов уровень этих аберраций существенно повышен, что наглядно подтверждается данными, представленными на рис. 5. Анализ полученных данных свидетельствует о парадоксальном явлении — с течением времени, несмотря на вариации, уровень этих аберраций оставался стабильно повышенным и к 2006 г. практически сохранился равным уровню на момент начала исследований (1991 г.). Учитывая, что по литературным данным [2] обновление пула лимфоцитов происходит в течение 3—5 лет, совершенно очевидно, что мы имеем дело с аберрациями, возникшими *de novo*, что может быть обусловлено феноменом геномной нестабильности либо прямым вовлечением стволовых клеток костного мозга.

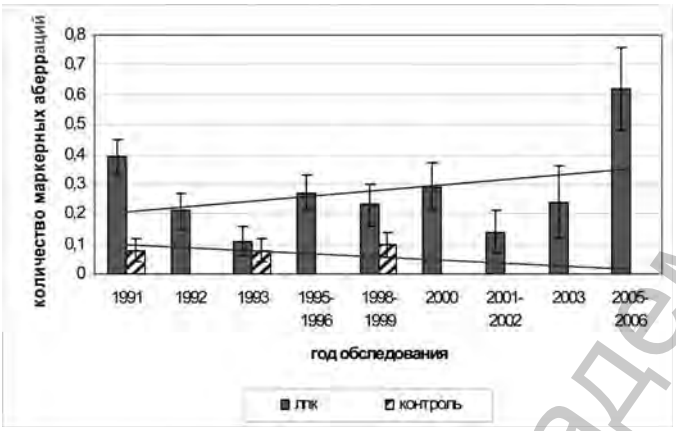


Рис. 5. Динамика маркерных аберраций у ликвидаторов 1986—1987 гг.

Кроме того, в отличие от эффекта облучения в больших дозах, когда частота индуцируемых ДХ, как правило, в 2 и менее раз превышает частоту ацентрических фрагментов, по нашим результатам уровень ацентрических фрагментов в несколько раз выше уровеня ДХ. Такая ситуация типична для случаев облучения в малых дозах или облучения при малой мощности дозы [3].

Еще один параметр, отражающий общую дестабилизацию генома - динамика суммарной частоты аберраций, графическое изображение которой приведено на рис. 6.

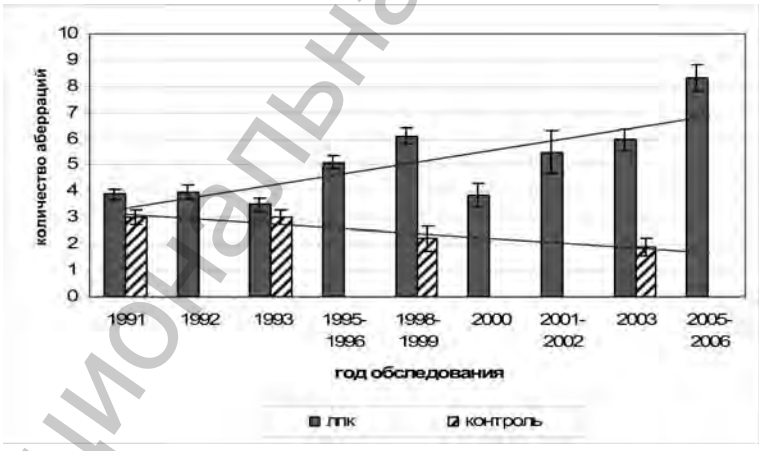


Рис. 6. Динамика суммарной частоты аберраций у ликвидаторов.

Анализ графика представленного на рисунке 6 четко свидетельствует об однозначном нарастании суммарного числа аберраций у обследованного контингента с течением времени.

Национальная академия наук Беларуси

Таким образом, приведенные результаты свидетельствуют о том, что даже в отдаленные периоды после облучения в соматических клетках человека наблюдается значительное изменение цитогенетического статуса, что выражается как в постоянном нарастании общего числа аберраций, так и в сохранении частоты маркерных аберраций.

Сходная ситуация наблюдается и у детей, проживающих на радиоактивно загрязненных территориях в отдельных населенных пунктах Брестской и Гомельской областей [4]. Реакция детского организма на действие антропогенных факторов значительно отличается от реакции взрослого. Общепризнанно, что чем младше ребенок, тем более выражены у него специфические эффекты неблагоприятных воздействий, а для последствий низкодозовых радиационных воздействий характерно медленное развитие аномальных процессов с широким индивидуальным разбросом их характеристик. Нарушения, возникающие при этом в организме, являются неспецифическими и могут быть усилены воздействием других, трудно идентифицируемых, факторов нерадиационной природы [5].

Так, при обследовании детской популяции Беларуси нами было показано, что экологическое неблагополучие вызывает у детей формирование симптомов состояния нестабильности генома, выражающееся, в первую очередь, в повышенном уровне маркеров радиационного воздействия и нарастания общей частоты аберраций и аберрантных клеток (Табл. 1).

Таблица 1.

Сравнительный анализ цитогенетического статуса детей и подростков из разных районов Беларуси

Параметры (среднее ± стандартная ошибка)	**Области**				**p***
	Минская	Гомельская	Могилевская	Брестская	
Общее количество метафаз в анализе	8723	31761	13535	20249	–
Параметры (среднее ± стандартная ошибка)	**Области**				**p***
	Минская	Гомельская	Могилевская	Брестская	
Количество метафаз на пациента, %	98,33+ 24,02	279,72± 24,01	410,22± 76,14	225,61 ± 11,63	–
Одиночные фрагменты, %	1,11± 0,16	1,92± 0,15	2,71± 0,14	2,25± 0,19	1-2,3,4; 2-3<0,05
Парные фрагменты, %	0,43±0,10	0,99± 0,21	2,03±0,25	1,03+ 0,14	1-2,3,4;3-4; 2-3<0,05
Дицентрики и кольца, %	0,04± 0,02	0,26+ 0,05	0,58+0,09	0,21+ 0,05	1-2,3,4;3-4; 2-3<0,05
Атипичные хромосомы, %	0,01±0,01	0,02± 0,01	-	0,01± 0,01	2,3,4-1>0,05
Полиплоидные клетки, %	0,10±0,08	0,18± 0,04	0,33± 0,08	0,06± 0,03	3-1;3-4; 3-2<0,05
Всего аберраций, %	1,64± 0,23	3,45± 0,37	5,75± 0,35	3,73± 0,29	2,3,4-1; 3-4; 3-2<0,05
Аберрантных клеток, %	1,60± 0,22	3,05± 0,30	5,13± 0,31	3,44± 0,28	2,3,4-1;3-4; 3-2<0,05

Примечание: здесь и далее Р в случае параметрической выборки оценена по критерию Стьюдента; непараметрической – по критерию Мана-Уитни.

Национальная академия наук Беларуси

Причины и механизмы формирования геномной нестабильности в настоящее время не выяснены. Непонятным остается то, почему сохраняются генетические повреждения через длительный промежуток времени. Однако, недавно открытые феномены позволяют взглянуть на эти данные несколько иначе.

Д-р И. Эмирит и ее соавторами [6] было показано, что в сыворотке крови лиц, пострадавших в результате ликвидации последствий аварии на ЧАЭС или проживающих на загрязненной радионуклидами территории, отмечается повышенное содержание кластогенных факторов (КФ), которые впервые были описаны в плазме крови лиц, подвергавшихся воздействию ионизирующей радиации или же лиц, проходивших радиотерапию [7].

Анализ состава сыворотки показал, что КФ — это смесь прооксидантов, обладающих хромосомоповреждающими свойствами. КФ образуются не только в результате действия ионизирующего излучения, но также наблюдаются и при различных патологических состояниях — у пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями соединительной ткани и пищеварительного тракта, ВИЧ-инфекциями. По-видимому, кластогены присутствуют в крови человека при целом ряде заболеваний, в патогенезе которых отмечен окислительный стресс. Кластогенный эффект опосредуется супероксидными-анион радикалами. В то же время супероксид дисмутаза блокирует их действие. На основании этого Эмирит еще в 1997 году [8] предложила термин «супероксид-опосредованный кластогенез».

Супероксидные радикалы являются не прямыми ДНК-повреждающими агентами, а инициаторами серии событий, приводящих к формированию кластогенного эффекта. Как оказалось, эти события опосредуются тремя основными классами химических веществ:

— продукты перекисного окисления липидов, такие как гидроперекись, малоновый диальдегид и 4-гидроксиноненал, образующиеся из арахидоновой кислоты мембран;

— цитокины, такие как альфа фактор некроза опухолей;

— атипичные нуклеотиды, такие как инозинди- и трифосфат.

Полагают, что КФ ответственны за длительный во времени окислительный стресс и долгосрочные генотоксические эффекты. Так, по данным литературы, ультрафильтрат сыворотки ликвидаторов вызывал в тестовой культуре (лимфоциты периферической крови) значительное увеличению частоты хромосомных аберраций, что отражает истинную величину кластогенности (разница между спонтанной и индуцированной частотой микроядер). Аналогичный эффект отмечен и у детей, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС [8].

Возможно, эффект кластогенных факторов можно рассматривать как проявление одной из форм байстендер эффекта *in vivo* – передача сигнала обеспечивается молекулами-мессенджерами, распространяющимися в жидкой фракции крови. В этом смысле кластогенный эффект может рассматриваться как форма проявления байстендер эффекта (в широком смысле слова) на уровне целостного организма.

В пользу этого свидетельствует серия работ проф. Mothersil. Так, ею была показана возможность индукции байстендер эффекта при γ-облучении путем переноса культуральной среды от облученных клеток необлученным минимум через час после облучения (после формирования фактора, вызывающего этот эффект).

Кроме того, установлено [9] что культуральная среда клеток, облученных низкими дозами альфа-частиц, перенесенная необлученным клеткам, может индуцировать статистически значимое нарастание частоты сестринских хроматидных обменов.

Необходимо отметить, что несмотря на то, что байстендер эффект в последние десятилетия очень активно изучается, опосредующие его механизмы до сих пор точно не установлены. Анализ литературы свидетельствует о существовании, по крайней мере, двух вероятных механизмов его индукции:

— через межклеточные контакты (опосредуется действием белка *p53* и индуцируемого им *CDKN1A/p21* – белка, вовлеченного в контроль рестрикционных точек клеточного цикла);

— посредством секреции специфических факторов (цитокины или факторы, оказывающие влияние на внутриклеточный уровень различных форм активного кислорода) [10]. Также было показано, что первый механизм не обязателен для формирования радиационно-индуцированного байстендер эффекта [11].

С другой стороны, хорошо известно, что окислительный стресс наблюдается у пациентов, страдающих вирусными инфекциями. Кроме того, ранее нами было показано, что

Национальная академия наук Беларуси

персистирование вируса гепатита у ликвидаторов, сопряжено с дестабилизацией цитогенетического статуса, что может существенно сказаться при оценке биологическими методами перенесенных ими дозовых нагрузок.

В соответствии с вышеприведенными фактами, в настоящей работе нами проведена оценка уровня кластогенных факторов в сыворотке крови лиц, страдающих циррозом печени (следствие вирусного гепатита С) и острыми респираторными вирусными инфекциями (в активной стадии заболевания), в сравнении с их уровнями у лиц, подвергшихся протрагированному (ликвидаторы 1986-1987 гг.) или хроническому радиационному воздействию (работники Полесского государственного радиационного заповедника (ПГРЗ)). Основные результаты исследований суммированы в таблице 2.

Таблица 2

Кластогенный эффект сыворотки различных групп населения

Группа	Клеток в анализе	Частота клеток с микроядрами (МЯ), ‰			Частота МЯ, ‰	Частота клеток с МЯ, ‰
		1 МЯ	2 МЯ	3 МЯ		
Контроль	11000	77,4±11,1	6,5±1,6	0,44±0,3	91,8±12,4	84,3±11,5
Ликвидаторы	7000	212,2±12,2	31,6±2,6	2,49±1,1	277,4±14,0	246,1±13,3
Сотрудники ПГРЗ	6000	207,8±10,9	22,7±3,8	1,9±0,1	260,3±18,3	232,2±13,1
Пациенты с циррозом печени (гепатит С)	11000	130,5±7,7	11,8±1,8	0,8±0,3	156,5±11,2	143,1±9,3
Пациенты с острой вирусной инфекцией	3500	190,2±6,6	87,7±4,8	23,3±2,3	435,6±8,4	301,2±7,8

По частоте клеток с микроядрами и частоте микроядер в контроле можно судить об уровне спонтанного мутагенеза (он сравнительно невысок). Данные таблицы 2 убеждают нас в том, что невелика доля клеток с двумя микроядрами и ничтожна с тремя, основная масса клеток имеет одно микроядро. Совершенно противоположные результаты в опытных вариантах.

Данные, представленные в таблице 2, убедительно свидетельствуют о том, что у лиц, подвергающихся хроническому радиационному воздействию (сотрудники ПГРЗ), наблюдается явное нарастание мутационного давления, что выражается в существенном увеличении частоты микроядер (практически в 3 раза относительно уровня контроля - 277,4±14,0‰ против 91,8±12,4‰, $P<0,01$), при этом отмечается существенное нарастание частоты клеток с несколькими микроядрами (в среднем количество клеток с двумя и тремя микроядрами увеличено в 3-4 раза). Таким образом, представленные данные убедительно свидетельствуют о том, что хроническое низкоинтенсивное радиационное воздействие существенно влияет на уровень накопления кластогенных факторов.

Практически, аналогичная картина имеет место и при сравнительном анализе частоты индукции микроядер между контрольной группой и группой ликвидаторов (лиц, подвергшихся достаточно выраженному, но кратковременному воздействию радиационного фактора). Так, общая частота микроядер 260,3±18,3 и частота клеток с микроядрами 232,2±13,1 у ликвидаторов статистически достоверно отличается от соответствующих показателей контроля (в обоих случаях $P<0,01$). Так же, как и в случае работников ПГРЗ, отмечается явное и высокодостоверное нарастание частоты клеток с несколькими микроядрами (Рис. 7).

Национальная академия наук Беларуси

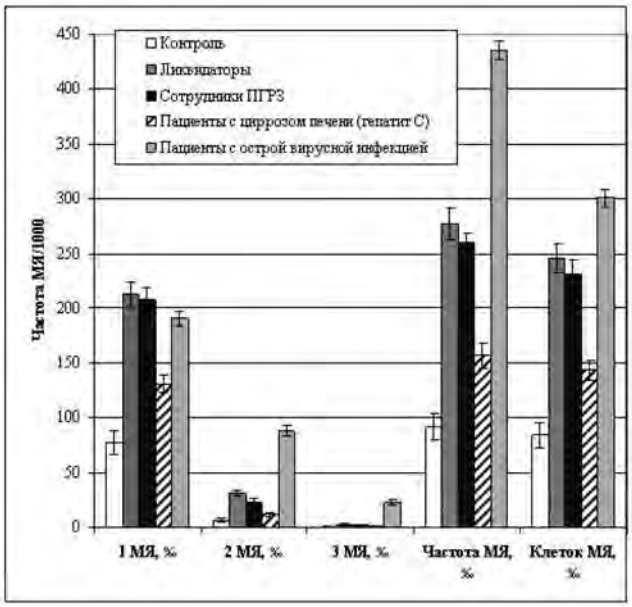


Рис. 7. Частота моно- и полимикроядерных клеток, индуцированных сывороткой пациентов различных групп.

В то же время, сравнительный анализ групп ликвидаторов и сотрудников ПГРЗ по данным рисунка 7 наглядно демонстрирует отсутствие между ними статистически значимых различий. Последнее может указывать на то, что остаточные эффекты предшествовавшего радиационного воздействия могут быть зафиксированы и в отдаленные (более 15 лет с момента воздействия) сроки, что свидетельствует о необходимости дальнейшего тщательного контроля и обследования пострадавших во время Чернобыльской аварии популяций. Следует также отметить, что эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными ранее на жителях Хиросимы. В то же время, данные о кластогенном эффекте сыворотки сотрудников ПГРЗ подтверждают ранее высказанные в некоторых работах предположения о возможно высокой эффективности низкодозовых хронических радиационных воздействий.

У пациентов, у которых наблюдается цирроз печени и хронический гепатит С, уровень индуцированных микроядер статистически достоверно отличается от контроля ($P<0,01$ для всех классов клеток с микроядрами), но существенно ниже, чем у пациентов, подвергшихся дополнительному радиационному воздействию (во всех случаях P также <0,01).

В то же время, у пациентов с острой вирусной инфекцией в активной стадии уровень микроядер превышает все ранее обсуждавшиеся случаи — частота микроядер у этой группы обследованных составила 435,6±8,4, а клеток с микроядрами — 301,2±7,8, что существенно превышает аналогичные показатели у ликвидаторов (277,4±14,0 и 246,1±13,3, соответственно; в обоих случаях — $P < 0,01$), что по-видимому, свидетельствует о чрезвычайно высоком уровне оксидантов в активной стадии острой вирусной инфекции.

Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют не только о том, что уровень кластогенности может соответствовать степени активности протекающих патологических процессов, но и о том, что мощный окислительный стресс, вызванный острой вирусной инфекцией, может существенно сказаться на уровне кластогенных факторов и, таким образом, потенциально создать опасность временной дестабилизации генома соматических клеток.

В целом, представленные данные указывают на эффективность использованного методического подхода, основанного на использовании культуральной клеточной линии с блокированной активностью гена p53 (т.е. с инактивированной одной контрольной точкой клеточного цикла).

На наш взгляд, одной из наиболее вероятных причин формирования геномной нестабильности являются кластогенные факторы. Это можно упрощенно представить в следующей схеме.

Национальная академия наук Беларуси

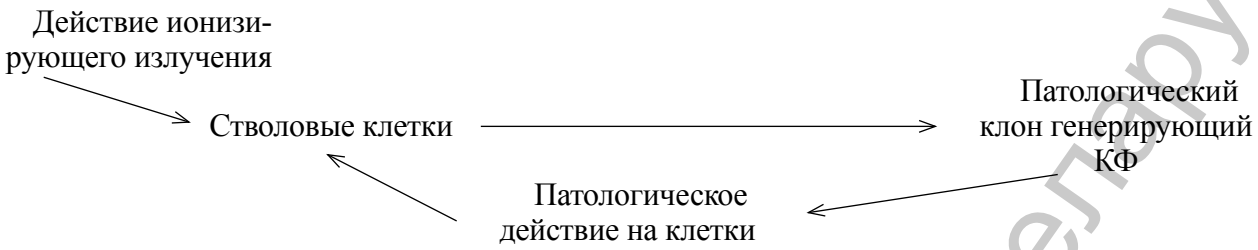


Рис. 8. Гипотетическая схема реализации эффектов кластогенных факторов в облученном организме.

Таким образом, формируется петля обратной связи, способная самоподдерживаться на протяжении длительного временного периода. Биологическое знание этого феномена на сегодняшний день неизвестно, однако можно предположить, что он играет определенную роль в обеспечении генетического разнообразия в условиях протекания активных адаптационных процессов на популяционном уровне, ориентированных на отбор наиболее «оптимального» генотипа.

Список литературы

1. Отчет НКДАРООН за 2000г. — М: РАДЭКОН, 2001. — 152 с.

2. Хаймович, Т.И., Горбунова, И.Н., Нагиба, В.И., Иванов, К.Ю. Цитогенетический эффект в соматических клетках профессионалов-атомщиков, принимавших участие в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС// Экологическая Антропология. Ежегодник Материалы VII Межд. науч.-практ. конф. «Экология человека в постчернобыльский период», 27-29 сент.,1999г. Минск: Белорусский комитет «Дзеці Чарнобыля». С 312—315.

3. Мельнов, С.Б. Биологическая дозиметрия: теоретические и практические аспекты / С.Б. Мельнов. — Минск.: Белорусский комитет «Дзеці Чарнобыля», 2002. — 192 с.

4. Последствия Чернобыльской катастрофы: Здоровье человека / В.А. Шевченко; под общ. ред. Е.Б. Бурлаковой. — М.: Наука, 1996. — С. 51—66.

5. Нестеренко, В.Б. Радиационная защита населения / — Минск: Право и экономика, 1997.—172 с.

6. Данилов, И.П. Состояние периферической крови детей, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях / И.П. Данилов, Я.С. Микша // Состояние гематоиммунной системы у детей Беларуси после катастрофы на ЧАЭС: науч.-практ., материалы 1986-1996 гг. — Минск, 1996. — С. 11—26.

7. Clastogenic factors as biomarkers of oxidative stress after radiation exposure / I. Emerit // Int J. Radiat Med. — 1999. — Vol. 2. — P. 25—33.

8. Transferable clastogenic activity in plasma from persons exposed as salvage personnel of the Chernobyl reactor / I. Emerit [et al.] // J. Cancer Res. Clin. Oncol, — 1994. — Vol 120. — P. 558—561.

9. Clastogenic factors in the plasma of children exposed at Chernobyl / I. Emerit [et al.] // Mutat. Res. — 1997. — Vol. 373. — P. 47—54.

10. Mothersill, C. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells / C. Mothersill? C.B. Seymour // Int J. Radiat. Biol. — 1997. — Vol. 71(4). — P. 421 — 427.

11. Lyng, F.M. Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis / F.M. Lyng, C.B. Seymour, C. Mothersill. // British Journal of Cancer —2000. — Vol. 83. — P. 1223—1230.

12. Mothersill, C. Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium / C. Mothersill, C.B. Seymour // Radiat Res. — 1998. — Vol. 149. — P. 256—262.

Дата поступления статьи 18 апреля 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 577.218:616-006

К.А. Архипова, А.Н. Тележкина, И.Б. Зборовская

РОЛЬ КАВЕОЛИНА-1 В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ (ОБЗОР)

НИИ канцерогенеза ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН
Россия, 115478, г. Москва , Каширское шоссе, 24

Введение

Кавеолы были описаны еще в 50-х годах прошлого столетия как υ-образные впячивания плазматической мембраны диаметром от 50 до 100 нм [1]. Кавеолы обнаруживаются в плазматической мембране многих типов тканей, однако их количество и форма варьируют. Так, ими особенно богаты адипоциты, эндотелиальные клетки, пневмоциты I типа, фибробласты, гладкие и поперечно-полосатые клетки мышечной ткани. В пневмоцитах I типа и эндотелиоцитах кавеолы могут занимать до 70 % площади поверхности плазматической мембраны. В клетках развивающихся скелетных мышц кавеолы имеют гроздевидную форму, в адипоцитах они встречаются в виде розеток. В эндотелиальных клетках кавеолы могут формировать отдельные трубочки, иногда пересекающие клетку насквозь. В то же время, нейроны центральной нервной системы и лимфоциты полностью лишены их.

Материалы и методы

В работе проанализированы материалы научных статей (опубликованных в PubMed Medline), связанных с ролью кавеолина-1 в нормальной жизнедеятельности клетки и его влиянии на процессы опухолевой трансформации.

Результаты и обсуждение

Кавеолы являются формой липидных рафтов — участков плазматической мембраны, богатых холестеролом и сфинголипидами (гликосфинголипидами и сфингомиелином), а также большим количеством сигнальных молекул, таких как тирозинкиназы семейства Src, G- белки и их рецепторы, протеинкиназы C, eNOS, и многими другими (Рис.1). Для связывания с мембраной эти молекулы часто имеют различные липидные модификации, например одну или несколько миристиновых, пальмитиновых, пренильных групп или гликозилфосфатидилинозитольный «якорь» (GPI).

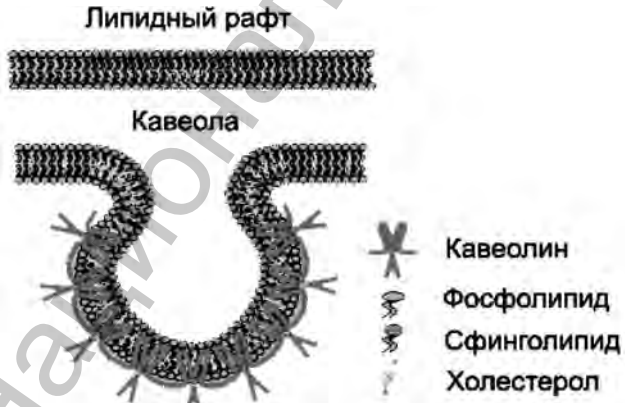


Рис. 1. Строение кавеол. Адаптировано из [2].

Национальная академия наук Беларуси

Белки семейства кавеолинов являются принципиальными структурными компонентами кавеол. В настоящее время, это семейство состоит из трех белков — кавеолина-1, -2 и -3. Кавеолины-1 и -2 имеют изоформы, формирующиеся за счет инициации трансляции с альтернативных сайтов и, соответственно, отличающиеся длиной N-концевого участка.

Кавеолины-1 и -3 схожи функционально и имеют бульшую степень гомологии между собой, чем с кавеолином-2. Наибольший уровень содержания кавеолинов отмечается в дифференцированных клетках организма, однако, их распределение тканеспецифично: кавеолины-1 и -2 распространены довольно широко, в то время как кавеолин-3 экспрессируется исключительно в мышечных тканях, где, судя по всему, и является функциональным аналогом кавеолина-1 [2-4].

Нормальная физиология клетки и кавеолин-1

Структура кавеолинов. Наиболее изученной среди белков семейства является структура кавеолина-1 (Рис. 2).

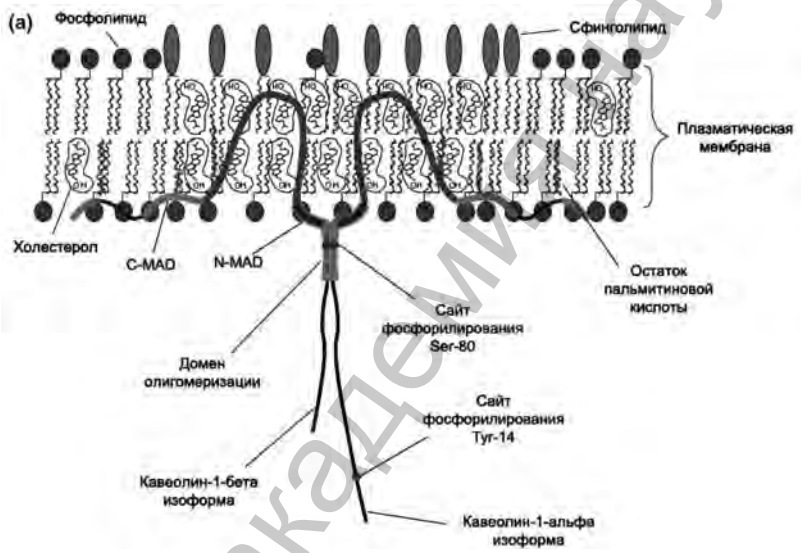


Рис. 2. Строение кавеолина-1 (адаптировано из [4]).

Молекула белка частично встроена в плазматическую мембрану. Анализ последовательности кавеолина-1 выявил гидрофобный участок (остатки 102-134), длины которого недостаточно для двукратного прохождения липидного би-слоя. Таким образом, структура белка содержит неполную шпильку, образованную 32 аминокислотными остатками гидрофобного домена. В стабилизации молекулы кавеолина-1 на мембране большую роль играют 2 мембрансвязывающих домена (N-MAD и C-MAD, C(N)-terminal membran attachment domain), а также остатки пальмитиновой кислоты на С-конце.

Важнейшим участком молекулы кавеолина-1 является домен CSD (caveolin scaffolding domain, 82-101 остатки), который представляет собой амфифильную α-спираль, богатую остатками ароматических и положительно заряженных аминокислот и частично погруженную в липидный би-слой. Именно за счет этого домена кавеолин-1 может непосредственно взаимодействовать с различными сигнальными молекулами, участвуя, таким образом, в регуляции их активности.

Молекула кавеолина-1 имеет два ключевых сайта фосфорилирования — Tyr14 и Ser80, за счет фосфорилирования которых осуществляется регуляция активности и топологии молекулы [5].

Кавеолин-1 способен формировать стабильные комплексы массой 350-400 кДа. Связывание 14 —16 молекул белка происходит за счет доменов олигомеризации. Однако, наряду с гомоолигомерами кавеолин-1 может образовывать комплексы с кавеолином-2, путем взаимодействия своими внутримембранными участками. Олигомерные комплексы могут формировать целые сети, за счет взаимодействия С-концов молекул кавеолина-1, что приводит к изгибанию и образованию характерного впячивания плазматической мембраны — кавеолы [6].

Национальная академия наук Беларуси

Роль кавеол в везикулярном транспорте. Различают три типа кавеол-зависимого транспорта веществ в клетку: эндоцитоз, трансцитоз и потоцитоз.

С помощью кавеолин-зависимого эндоцитоза в клетку поступает большое количество веществ. После отшнуровывания от плазматической мембраны кавеолы могут транспортироваться к различным внутриклеточным компартментам. Через кавеолы попадают в клетку также и вирус SV40, Эбола, полиомавирус и некоторые штаммы *Escherichia coli*.

Показано, что везикулы с холерным токсином, сформированные на апикальной поверхности клетки, перемещаются к аппарату Гольджи, затем к ЭПР и, в конце концов, скапливаются на базолатеральной поверхности клетки. При поглощении SV40 кавеолы, содержащие вирус, могут сливаться с крупными неэндосомальными нелизосомальными кавеолин-1 содержащими органеллами, которые направляются затем в ЭПР. Эти органеллы были названы «кавеосомами».

В интернализации и слиянии кавеол участвуют, вероятно, те же механизмы, что и в транспорте клатриновых везикул. В кавеолах обнаружены такие молекулы, как NSF (ATPase N-ethylmaleimide-sensitive factor), SNAP (synaptosomal associated protein), VAMP (venzilo-associated membrane protein), а также динамин, который связан с перешейками кавеол конститутивно или привлекается в ответ на специфические сигналы.

Ряд опытов показал, что кавеолы участвуют в трансцитозе — процессе транспорта веществ из капилляров к тканям через эндотелиоциты. Этим путем транспортируются многие белки сыворотки крови, в частности, основной сывороточный белок альбумин.

Кавеолы осуществляют также уникальную форму транспорта растворов, называемую потоцитозом. Это процесс, с помощью которого в клетку транспортируются низкомолекулярные соединения (<1 кДа) и ионы без отшнуровывания везикул. Наиболее изученным примером потоцитоза является поглощение фолата. После связывания фолата со своим локализованным в кавеолах рецептором происходит сужение перешейка везикулы. За счет работы протонного насоса происходит закисление среды внутри везикулы, в результате чего фолат диссоциирует от своего рецептора и с помощью анионного переносчика транспортируется в цитоплазму по градиенту концентрации [2,7,8].

Роль кавеолина —1 в гомеостазе холестерола. Холестерол является важным компонентом клеточных мембран. Ряд исследований показал, что кавеолы играют роль «ворот», через которые холестерол поступает в плазматическую мембрану и удаляется из нее. Кавеолин-1 имеет большое сродство к холестеролу, который, синтезируясь *de novo* в ЭПР, транспортируется к плазматической мембране в белковых комплексах в связанной с кавеолином-1 форме [9]. Транспортированный холестерол сначала поступает в кавеолы, и лишь затем распределяется по всей плазматической мембране.

Кавеолярный путь транспорта холестерола внутри клетки не является единственным. О существовании компенсаторных механизмов свидетельствует тот факт, что клетки с экстремально низким уровнем кавеолина-1, такие как гепатоциты, имеют интактный аппарат его транспорта.

В свою очередь, как было показано в ряде исследований, холестерол способен влиять на экспрессию гена кавеолина-1. Транскрипционный фактор SREBP-1 (sterol regylatory element-binding protein), который играет ключевую роль в регуляции синтеза холестерола и других липидов, может взаимодействавать с SRE элементом в промоторе гена кавеолина-1, усиливая его экспрессию [10].

Кавеолы и Ca^{2+} — волны. Недавние работы показали, что кавеолы могут участвовать в регуляции транспорта внеклеточного Ca^{2+} в клетку. В поляризованных эндотелиоцитах Ca^{2+}-волны возникают в богатой кавеолами хвостовой части клетки и оттуда распространяются к лидирующему концу. Кроме того, разрушение кавеол приводит к блокированию передачи Ca^{2+}-опосредованных сигналов. Действительно, в кавеолах локализуются молекулы, непосредственно участвующие в транспорте ионов Ca^{2+}, такие как Ca^{2+}-АТФаза, дигидропиридин — управляемые Ca^{2+}-каналы и каналы Trp1 и Trp3. Также в кавеолах обнаружен один из эффекторов Ca^{2+}-опосредованных сигналов — *eNOS* (endothelial nitric oxide synthase). Следовательно, совместная локализация этих белков может способствовать быстрой и эффективной передаче Ca^{2+}-опосредованного сигнала [11-13].

Кавеолы как «сигналосомы». В 1994 году Лизанти и соавторы предложили теорию «сигналосомы», согласно которой кавеолы, за счет непосредственного взаимодействия сигнальных молекул с кавеолином-1, способны регулировать не только отдельные сигнальные пути, но и способствовать их взаимодействию, концентрируя молекулы разных каскадов [14].

Национальная академия наук Беларуси

Многочисленные исследования показали, что кавеолин-l способен напрямую связываться с сигнальными молекулами, влияя на передачу сигнала, за счет домена CSD. В составе многих сигнальных молекул выявлен мотив, участвующий во взаимодействии с CSD, который назван кавеолин-1 — связывающим доменом (CBD, caveolin-1 binding domain). Хотя механизм связывания CSD и CBD до конца не установлен, известно, что оба домена обогащены ароматическими аминокислотами, которые могут участвовать в гидрофобных взаимодействиях [2].

Как правило, связывание кавеолина-1 с белком приводит к подавлению его активности. Наиболее хорошо изученным примером является регуляция эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). В состоянии покоя eNOS связан с кавеолином-1 и неактивен. При действии на клетки ацетилхолина происходит активация кальмодулина и связывание его с eNOS. В результате фермент освобождается от блокирующего воздействия кавеолина-1 и начинает синтезировать NO. После завершения действия ацетилхолина кавеолин-1 снова связывает и ингибирует eNOS. Таким образом, кавеолин-1 отвечает за подавление активности фермента в состоянии покоя, а при действии активатора eNOS освобождается от него [15]. Данный тип регуляции был показан и для ряда рецепторов ростовых факторов (VEGFR, PDGFR), нейтральной сфингомиелиназы, ERK1/2 и др. белков.

Модель нокаутных по гену кавеолина-1 мышей. Создание животных, нокаутных по тому или иному гену позволяет определить роль продуктов экспрессии этого гена в целом организме.

Изучение мышей с выключенными генами *CAV-1*, *-2* или *-3*, а также комбинации *-1/3* дало весьма неожиданные результаты. Все мыши оказались жизнеспособны, фертильны, без явных нарушений развития, морфологии и поведения. Однако более детальное рассмотрение органов и тканей таких животных выявило ряд отклонений от нормы [16].

При нокауте гена *CAV-1* наблюдалась полная утрата кавеол во всех тканях, что прямо подтверждает необходимость кавеолина-1 для их формирования. Кавеолы оказались важны для нормального функционирования богатых ими тканей и органов. Например, в строении легких происходили нарушения, выражающиеся в уменьшении диаметра и утолщении стенок альвеол. Это приводило к снижению скорости газового обмена и устойчивости экспериментальных животных к повышенным нагрузкам. Исследования жировой ткани *CAV-1* -/- мышей показали, что ее содержание снижено по сравнению с нормальными животными и размеры тела взрослых мышей оказались меньше, чем контрольных. Кроме того, нокаутные животные были устойчивы к диете с повышенным содержанием жиров [2].

Еще одним типом клеток, богатым в норме кавеолами, являются эндотелиоциты. Кавеолы играют важную роль в трансцитозе альбумина, поскольку он транспортируется из кровяного русла к тканям практически только с помощью кавеол. Потеря кавеол приводит к нарушению транспорта белка через эндотелиоциты и его накапливанию в кровеносных сосудах. Однако содержание альбумина в церебро-спинальной жидкости животных остается нормальным, что свидетельствует о существовании там компенсаторных путей его транспорта [17].

Исследуемые животные также имели нарушения в строении и функционировании молочных желез, такие как усиление ветвления протоков и гиперплазия их эпителия. Во время беременности у мышей наблюдали преждевременную лактацию [18,19].

Суммируя данные, полученные при изучении нокаутных по *CAV-1* мышей, можно отметить, что полная потеря экспрессии этого гена напрямую не увеличивает вероятность спонтанного образования опухолей, но может усиливать действие других канцерогенных стимулов, вызывающих образование опухолей молочной железы и кожи, что может быть связано с реализацией альтернативных систем регуляции [20]. Тем не менее, накопленные данные свидетельствуют об ассоциации кавеолина-1 с процессами, обеспечивающими опухолевый рост.

Роль кавеолина-1 в канцерогенезе

В настоящее время накоплено большое количество информации об изменении экспрессии кавеолина-1 в процессе злокачественной трансформации.

Показано, что уровень экспрессии кавеолина-1 снижается при трансформации клеток онкогенами Bcr/Abl, v-Abl, H-Ras, c-Src и c-Myc [21]. При введении вектора с антисмысловой последовательностью гена *CAV-1* клетки линии NIH 3T3 приобретали способность к независимому от субстрата росту и формированию опухолей у голых мышей. Реверсия нормального фенотипа достигалась восстановлением исходного уровня экспрессии кавеолина-1. Также известно, что при выключении гена кавеолина-1 усиливается действие на клетки других канцерогенных

Национальная академия наук Беларуси

стимулов. Например, фибробласты, нокаутные одновременно по генам INK4a и *CAV-1* и трансформированные онкогенами H-Ras(G12V) или v-Src, формируют опухоли в голых мышах больших размеров (в 8 и 40 раз соответственно), чем нокаутные лишь по гену INK4a [22].

Однако анализ клеточных линий опухолевого происхождения и образцов опухолей человека выявил более сложную картину. Экспрессия гена *CAV-1* может изменяться в зависимости от типа ткани, из которой произошла клеточная линия или опухоль [23-25]. Проведенные Равид и его коллегами эксперименты показали, что во всех исследованных клеточных линиях карциномы почек и простаты уровень мРНК *CAV-1* повышен; в линиях клеток меланомы и лейкемии, напротив — стабильно понижен; в клеточных линиях карцином лёгкого, молочной железы, яичников и толстого кишечника уровень экспрессии кавеолина-1 может варьировать [25].

Анализ образцов первичных опухолей человека показал, что в карциномах почек, простаты, пищевода и желудка, папиллярных карциномах щитовидной железы, астроглиомах и глиобластомах уровень экспрессии кавеолина-1 преимущественно повышен. Также он повышен или не отличается от нормы в доброкачественных опухолях мезенхимального происхождения (фиброматозы, лейомиомы, гемангиомы и липомы). Снижение уровня экспрессии кавеолина-1 наблюдается в опухолях яичников, толстой кишки, легкого и молочной железы, а также в большинстве злокачественных мезенхимальных опухолей, таких как фибросаркомы, лиомиосаркомы, липосаркомы, ангиосаркомы, гистиоцитомы и синовиальные саркомы. В опухолях прямой кишки и матки уровень экспрессии кавеолина-1 может варьировать [2, 21, 26-29].

На сегодняшний день накоплено большое количество данных о том, что изменение уровня экспрессии кавеолина-1 может коррелировать с метастазированием. На их основе была предложена концепция двухфазного типа экспрессии кавеолина-1, когда на фоне конститутивно сниженной экспрессии кавеолина-1 в первичной опухоли, повышение экспрессии белка может играть роль в выживании клеток на стадии метастазирования [21, 30].

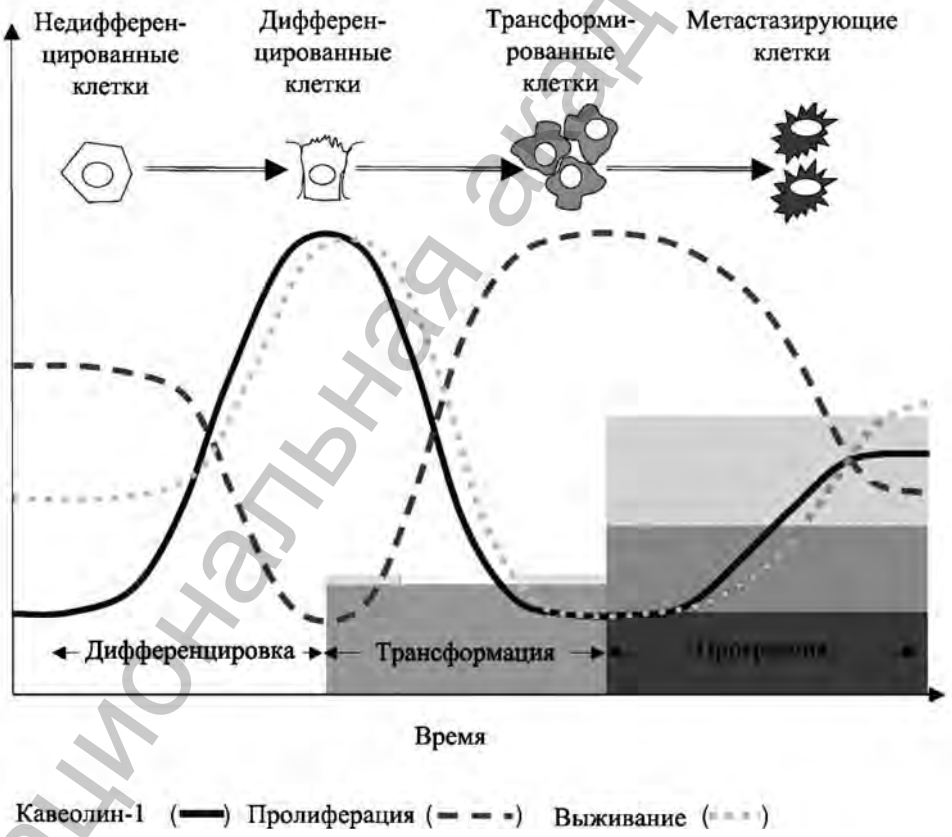


Рис. 3. Изменения экспрессии кавеолина-1 в зависимости от степени дифференцировки и стадии опухолевой прогрессии (адаптировано из [25]).

Национальная академия наук Беларуси

Обобщив имеющиеся на сегодняшний день данные, Равид и др. предложили схему, объясняющую возможные варианты экспрессии кавеолина-1 в зависимости от степени дифференцировки клеток и стадии опухолевой прогрессии. Как видно из рис. 3, динамические изменения уровня экспрессии кавеолина-1 прямо пропорциональны выживанию клеток и обратно пропорциональны скорости их пролиферации. Экспрессия кавеолина-1 снижена в быстро делящихся низкодифференцированных клетках, однако повышается при дифференцировке большинства типов тканей. Эта гипотеза подтверждается теми фактами, что при трансформации клеточных линий онкогенами уровень экспрессии кавеолина-1, как правило, сильно снижается. Существуют данные, что экспрессия кавеолина-1 варьирует в зависимости от степени дифференцировки и злокачественности опухолей одного гистогенеза [31], а так же, что высокий уровень экспрессии кавеолина-1 играет большую роль в выживании трансформированных клеток на стадии метастазирования.

Генетические и эпигенетические изменения в гене кавеолина-1. Гены *CAV-1* и *-2* картированы в регионе q31.1 седьмой хромосомы человека. Маркером данного региона является микросателлит D7S522, расположенный на 67 kb левее *CAV-2*. Как известно, локус 7q31.1 часто делетируется в опухолях эпителиального происхождения, таких как карциномы молочной железы, прямой кишки, почек, простаты, яичников, опухолях головы и шеи [32]. Это позволило предположить, что в данном регионе расположен ген ранее неизвестного опухолевого супрессора и первыми локализованными в локусе 7q31.1 генами были *CAV-1* и *-2*. Однако, утверждение, что именно кавеолины являются искомыми генами супрессорами, до сих пор остается спорным, поскольку позднее в локусе 7q31.1 картирован еще один ген, ST7, для которого показано участие в злокачественной трансформации [33]. Возможно, что потеря обоих генов — *CAV-1* и ST7 — при делеции локуса 7q31.1 играет роль в малигнизации клеток.

В гене кавеолина-1 выявлены генетические нарушения, ассоциированные с опухолевой трансформацией. Анализ, проведенный Хаяши и др., показал, что *CAV-1* мутирован в 16 % исследованных случаев рака молочной железы у человека, причем преимущественно в наиболее злокачественных формах. Мутация P132L не обнаруживалась в соседних с опухолями нормальных тканях пациентов и в образцах тканей здоровых людей. Это позволило заключить, что нарушение носит соматический характер. Чтобы понять роль мутантного гена кавеолина-1 P132L в развитии карцином молочной железы, культуры клеток NIH 3T3 были трансфецированы вектором, содержащим мутантный аллель *CAV-1* P132L. Такие клетки приобретали свойства трансформированных и были способны расти в жидком агаре. Кроме того, в них происходило изменение структуры актинового цитоскелета, увеличение подвижности и способности к инвазии, а также активация MAPK каскада. Далее была проведена одновременная трансфекция клеток векторами с геном *CAV-1* P132L и дикого типа. Эта модель позволила воссоздать картину, наблюдаемую в гетерозиготных по *CAV-1* клетках карциномы молочной железы человека. При анализе локализации белка дикого типа показано, что его распределение внутри клетки нарушается, и он удерживается в комплексе Гольджи, не транспортируясь к плазматической мембране. Вероятно, дефектный продукт мутантного аллеля инактивирует нормальный белок, образуя с ним олигомерные комплексы, которые удерживаются в аппарате Гольджи, не достигая плазматической мембраны. Таким образом, мутация носит доминантно-негативный характер [34].

При исследовании эпигенетических изменений гена *CAV-1* в опухолях, показано, что в клетках эпителия молочной железы CpG-островки в промоторе *CAV-1* как правило не метилированы, что согласуется с высоким уровнем его экспрессии [35]. Однако, в клеточных линиях карциномы молочной железы может происходить метилирование, приводящее к снижению экспрессии кавеолина-1 [36]. Частота метилирования промотора также повышена в клетках аденокарциномы простаты по сравнению с соседними нормальными тканями [37]. Эти данные подтверждают роль эпигенетических изменений в регуляции транскрипции гена кавеолина-1 и процессе опухолевой трансформации.

Роль кавеолина-1 в регуляции пролиферации. В настоящее время накоплено большое количество данных о роли кавеолина-1 в ре-

Национальная академия наук Беларуси

гуляции клеточной пролиферации. Замечено, что гиперэкспрессия кавеолина-1 в клетках уменьшает скорость их деления и приводит к задержке клеточного цикла в G_0/G_1 фазе. И наоборот, понижение экспрессии кавеолина-1 сопровождается возрастанием доли клеток в S и снижением в G_0/G_1 фазах клеточного цикла. Так как гиперэкспрессия кавеолина-1 сопровождается активацией p53, то это позволило предположить, что остановка клеточного цикла в поздней G1 фазе происходит по p53-зависимому пути [38]. Эти факты хорошо согласуются с гипотезой, предложенной Равид и соавторами [25].

Антипролиферативный эффект кавеолина-1 может быть обусловлен его способностью влиять на многие регуляторные пути за счет взаимодействия с локализованными в кавеолах сигнальными молекулами, например, рецепторами ростовых факторов EGF, VEGF, FGF. Кроме того, подавление гена кавеолина-1 приводит к конститутивной активации MAP киназ Mek-1/2 и Erk-1/2. Также было показано, что кавеолин-1 взаимодействует с неактивными изоформами белков семейства RAS и привлекает их к плазматической мембране [39].

Роль кавеолина-1 в регуляции клеточного цикла обусловлена, в первую очередь, его способностью ингибировать активность гена циклина D1. Воздействие может осуществляться сразу по нескольким механизмам. Во-первых, подавление экспрессии может происходить за счет непосредственного связывания кавеолина-1 с промоторной областью гена циклина D1 [40]. Во-вторых, кавеолин-1 может подавлять β-катенин-Lef сигнальный путь, активирующий экспрессию циклина D1. В итоге уровень экспрессии гена снижается, что приводит к остановке клеточного цикла в G_0/G_1 фазе [41].

Влияние кавеолина-1 на апоптоз. Многочисленные исследования показали, что изменение экспрессии гена *CAV-1* в различных опухолевых и неопухолевых клетках влияет на инициацию апоптоза. При повышении экспрессии данного гена увеличивается чувствительность ряда клеток к действию проапоптотических стимулов. Так, фибробласты становятся более чувствительными к церамиду и γ-излучению, а клетки карциномы мочевого пузыря к стауроспорину [24]. Однако, так происходит не везде, например, в клетках аденокарциномы простаты человека кавеолин-1 проявляет антиапоптотические свойства. Показано, что в клетках опухоли происходит фосфорилирование кавеолина-1 по Ser80, из-за чего белок меняет свою топологию, превращаясь в секретируемый из клетки продукт. После обработки среды антителами к кавеолину-1 эффект прекращается, что свидетельствует об аутокринном или паракринном действии белка на клетки опухоли. Однако, возможен и другой механизм антиапоптотического воздействия кавеолина-1 на клетки аденокарциномы простаты. Ряд исследований показал, что кавеолин-1 может связывать и ингибировать серин-треониновые фосфатазы PP1 и PP2A. В результате этого увеличивается активность их субстратов, в том числе и киназы Akt/PKB. Благодаря действию кавеолина-1, Akt/PKB более длительное время остается фосфорилированным и подавляет клеточную гибель [42].

Кроме того, снижение экспрессии кавеолина-1 может увеличивать содержание такого мощного антиапоптотического фактора как сурвивин [43].

Так, в клетках линии NIH 3T3 подавление экспрессии кавеолина-1 повышает чувствительность к одному апоптотическому стимулу — пероксиду водорода и одновременно уменьшает к другому — стауроспорину [44]. Таким образом, при увеличении или уменьшении экспрессии кавеолина-1 может происходить как усиление, так и ослабление инициации апоптоза в зависимости от типа ткани и природы апоптотического сигнала.

Существует несколько теорий, подкрепленных экспериментальными данными, о возможных механизмах про- и антиапоптотического действия кавеолина-1.

Кавеолы обогащены нейтральной сфингомиелиназой — ферментом, осуществляющим расщепление сфингомиелина до церамида, который является ингибитором PI3K-Akt пути выживания и индуктором апоптоза [45]. Активность сфингомиелиназы может ингибироваться кавеолином-1, который связывается с ферментом своим доменом CSD и блокирует его. С другой стороны, при действии на клетку апоптотических сигналов образование церамида может усиливаться. При этом, на плазматической мембране фибробластов образуются

Национальная академия наук Беларуси

комплексы, содержащие церамид, регуляторную субъединицу PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) и кавеолин-1. В этом случае кавеолин-1 необходим для опосредованного церамидом подавления активности PIK3 [46]. Следовательно, кавеолин-1 увеличивает чувствительность фибробластов к индуцируемому церамидом апоптозу, подавляя PI3K-Akt путь выживания.

Противоположную роль в регуляции PI3K-Akt пути кавеолин-1 играет в клетках миеломы человека. Уровень кавеолина-1 в трансформированных клетках выше, чем в нормальных плазматических клетках крови. Показано, что в клетках миеломы кавеолин-1 колокализуется с рецепторами интерлейкина-6 (IL6) и инсулин-подобного фактора роста —1 (IGF-1), которые передают ростовые сигналы внутрь клетки, активируя PI3K. IL-6 и IGF-1, а также другие ростовые факторы индуцируют фосфорилирование кавеолина-1 по Tyr 14. Ингибирование этого процесса блокирует образование комплексов белка с рецепторами IL-6 и IGF-1 и последующую активацию PI3K-Akt пути. Следовательно, кавеолин-1 необходим для передачи сигнала по PI3K-Akt пути в клетках миеломы [47].

Роль кавеолина-1 в ангиогенезе. Ангиогенез — сложный многостадийный процесс образования новых кровеносных сосудов из предсуществующих, включающий в себя пролиферацию, миграцию и последующую дифференцировку эндотелиальных клеток, сопровождающийся увеличением проницаемости сосудов и деградацией внеклеточного матрикса.

Исследования показали, что изменение экспрессии кавеолина-1 может влиять на клеточную миграцию и ангиогенез. В опытах, проведенных *in vitro* и *in vivo*, подавление экспрессии кавеолина-1 приводило к ухудшению формирования капилляро-подобных структур и снижению скорости ангиогенеза [11,48,49].

Напротив, гиперэкспрессия кавеолина-1 в эндотелиальных клетках или введение пептида, содержащего CSD домен, приводили к усилению и ускорению формирования тубулярных структур и последующему развитию капилляров. Исследования нокаутных по кавеолину-1 мышей показали, что полное отсутствие кавеолина-1 приводит к ухудшению ангиогенеза [11, 50]. Также кавеолин-1 усиливает ангиогенез в тканях аденокарциномы простаты. Повышение экспрессии кавеолина-1 в клетках сопровождается усилением клеточной миграции, синтеза оксида азота и формированием капилляро-подобных структур. В результате наблюдается увеличение размеров и числа метастазов, образующихся в лёгких [51, 52].

С другой стороны, кавеолин-1 может снижать проницаемость сосудов за счет ингибирования синтеза оксида азота эндотелиальной NO-синтазой. В результате ухудшается поступление к эндотелиоцитам макромолекул, в том числе ростовых цитокинов, стимулирующих их пролиферацию. Этим объясняется тот факт, что введение содержащего CSD домен пептида в клетки опухолей замедляет их развитие у мышей [11]. Как уже упоминалось, кавеолин-1 может взаимодействовать с рецепторами VEGF (VEGF-R2 и VEGF-R3), блокируя их активность, что в свою очередь приводит к замедлению пролиферации эндотелиоцитов [53,54]. Таким образом, кавеолин-1 может как стимулировать, так и ингибировать процесс неоангиогенеза .

Роль кавеолина-1 в метастазировании. Метастазирование — образование вторичных очагов опухолевого роста — это комплексный процесс, в основе которого лежит приобретение трансформированными клетками ряда более простых признаков, таких как способность к движению и проникновению в окружающие здоровые ткани, независимость от субстрата, способность изменять клеточное окружение, активирование систем деградации внеклеточного матрикса, и др.

На ранних стадиях опухолевой прогрессии особое значение приобретает проявление инвазирующими клетками локомоторного фенотипа. Движение клеток сопровождается изменениями морфологии, которые включают формирование ламеллоподий и филоподий на лидирующем конце, их прикрепление к субстрату, ток цитозоля вперед, открепление от субстрата и подтягивание «хвостовой» части клетки. При передвижении происходит поляризация клетки и определение лидирующего и отстающего конца, сопровождающееся перераспределением молекул и органелл. Показано, что в ходе таких морфологических изменений кавеолы также меняют свою локализацию, собираясь в «хвосте» мигрирующей клетки.

Национальная академия наук Беларуси

В перестройке цитоскелета большую роль играет Rho семейства малых ГТФаз. Малые ГТФазы RhoA, RhoC и Cdc42 локализованы в кавеолах и могут взаимодействовать с кавеолином-1 [13,55]. Большое количество исследований свидетельствует, что кавеолин-1 может участвовать в регуляции их активности. В клетках гладкой мускулатуры потеря экспрессии кавеолина-1 сопровождается увеличением активности RhoA, что указывает на ингибиторное действии кавеолина-1 на данный белок [56]. Исследования клеток аденокарциномы поджелудочной железы выявили обратную связь между уровнем экспрессии кавеолина-1 и активностью RhoC [57].

На всех этапах метастазирования важную роль играет деградация неопластической клеткой внеклеточного матрикса. Этот процесс осуществляется за счет систем деградации внеклеточного матрикса, к которым относятся матриксные металлопротеазы (MMP), аспартиловые, цистеиновые (катепсин В и др.) и сериновые (UPA) протеазы. Некоторые участники систем деградации внеклеточного матрикса, такие как рецептор UPA (urokinase plasminogen activator), матриксные металлопротеазы MT1-MMP, MMP-2 и MMP-9, катепсин В локализованы в кавеолах [13]. Таким образом, кавеолин-1 может как регулировать активность отдельных участников, так и участвовать в координации работы систем деградации внеклеточного матрикса.

Важную роль в процессах метастазирования играют межклеточные взаимодействия. Пониженная адгезивность к другим клеткам и матриксу является характерной чертой многих метастазирующих клеток. Она может быть связана с нарушением Е-кадгерин/β-катениновой системы. Установлено, что экспрессия кавеолина-1 необходима для нормального формирования межклеточных контактов, распределения молекул Е-кадгеринов в плазматической мембране и образования ими комплексов с β-катенином [58].

Образование контактов с внеклеточным матриксом обеспечивается рецепторами семейства интегринов. Они связывают фибронектин, коллаген и др. белки матрикса и передают пролиферативный сигнал, необходимый для стимуляции размножения клеток. Регуляция формирования интегринами контактов и передачи сигнала осуществляется киназами семейства Src и FAK, при этом образуются комплексы, включающие кавеолин-1 и UPAR. Более того, снижение экспрессии кавеолина-1 приводит к потере клетками фокальных контактов, сопровождающейся дефосфорилированием киназы FAK [59]. Это позволяет рассматривать кавеолин-1 как адапторный белок, регулирующий образование контактов с матриксом. Также получены данные о способности кавеолина-1 взаимодействовать с интегрин-связанными киназами (ILK). Гиперэкспрессия этих белков уменьшает адгезию клеток к матриксу, ингибирует апоптоз, вызывает изменение уровня экспрессии регуляторов клеточного цикла и т.д. В составе ILK обнаружен кавеолин-1 — связывающий домен, перекрывающийся с киназным [60]. При его взаимодействии с CSD активность киназ подавляется, они не фосфорилируются и удерживаются в цитоплазме. Выяснилось также, что вблизи кавеолин-1 — связывающего домена ILK имеется сигнал ядерной локализации, отвечающий за транспорт белков в ядро [61]. Следовательно, кавеолин-1 регулирует внутриклеточное распределение ILK за счет прямого связывания с ними и блокирования доступности сигнала ядерной локализации.

Заключение

Создание моделей нокаутных по кавеолинам-1, -2, -3 и -1/3 мышей позволило лучше понять роль этих белков для организма в целом. Выяснилось, что кавеолин-1 абсолютно необходим для образования кавеол в таких клетках, как адипоциты, эндотелиоциты, пневмоциты I типа, фибробласты и др. В свою очередь потеря кавеол приводит к нарушениям в богатых ими в норме тканях и органах. Хотя увеличения частоты спонтанного развития опухолей у нокаутных мышей не наблюдалось, усиливалось действие на них канцерогенных стимулов, вызывающих образование опухолей молочной железы и кожи. Это свидетельствует о роли кавеолина-1 в нормальном функционировании этих систем.

Национальная академия наук Беларуси

Исследования последних лет показали, что изменение экспрессии кавеолина-1 влияет на процессы, нарушение контроля которых способствует приобретению клетками злокачественного фенотипа. К ним относятся регуляция клеточной пролиферации, апоптоз, движение клеток и деградация внеклеточного матрикса, формирование контактов с соседними клетками и матриксом, способность модифицировать окружение и ускорять ангиогенез. Однако роль кавеолина-1 в этих процессах не всегда однозначна. К примеру, имеются данные о подавлении пролиферации клеток и остановке клеточного цикла в G_0/G_1 — фазе под действием кавеолина-1, увеличении чувствительности к индуцированному различными стимулами апоптозу, ухудшению процессов ангиогенеза и клеточной миграции. В то же время, кавеолин-1 стимулирует рост и выживание клеток аденокарциномы простаты, подавляет апоптоз и усиливает ангиогенез в опухолях. Все это говорит о сложности взаимодействий, в которых участвует этот белок, и неполноте современных знаний о его роли в клетках.

Изучение роли кавеолина-1 в канцерогенезе позволит использовать информацию о его экспрессии не только в диагностике, но, в большей степени, в биотерапии опухолей, а также пролить свет на фундаментальные процессы, протекающие в опухолевых клетках.

Список использованной литературы

1. Yamada, E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse / E. Yamada // J. Biophys. Biochem. Cytol. — 1955. — P. 445—458.

2. Razani, B. Caveolae: from cell biology to animal physiology / B. Razani et al. // Pharmacol. Rev. — 2002. — № 54. — P. 431—467.

3. Van, D.B., Roepstorff,K., Hommelgaard,A.M., and Sandvig,K.. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid cean / D.B. Van // Trends Cell Biol. — 2003. — № 13. — P. 92—100.

4. Williams,T.M., Lisanti, M.P. The caveolin proteins / T.M. Williams, M.P. Lisanti // Genome Biol. — 2004. — № 5. — P. 214.

5. Krajewska,W.M., Maslowska,I. Caveolins: structure and function in signal transduction / W.M. Krajewska, I. Maslowska // Cell Mol. Biol. Lett. — 2004. — № 9. — P. 195—220.

6. Parton, R.G., Hanzal-Bayer, M., Hancock, J.F. Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation / R.G. Parton, M. Hanzal-Bayer, J.F. Hancock // J. Cell Sci. — 2006. — № 119. — P.787—796.

7. Kirkham, M., Parton, R.G. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers / M. Kirkham, R.G. Parton // Biochim. Biophys. Acta. — 2005. — № 1745. — P. 273—286.

8. Lajoie, P., Nabi, I.R. Regulation of raft-dependent endocytosis / P. Lajoie, I.R. Nabi // J. Cell Mol. Med. — 2007. — №11. — P. 644—653.

9. Uittenbogaard, A., Ying,Y., Smart, E.J. Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking / A. Uittenbogaard, Y.Ying, E.J. Smart // J. Biol. Chem. — 1998. — № 273. — P. 6525—6532.

10. Shimano, H. Sterol regulatory element-binding protein family as global regulators of lipid synthetic genes in energy metabolism. / H. Shimano, // Vitam. Horm. — 2002. — № 65. — P. 167—194.

11. Frank, P.G. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function / P.G. Frank et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2003. — № 23. — P. 1161—1168.

12. Minshall, R.D., Sessa,W.C., Stan,R.V., Anderson,R.G., and Malik,A.BCaveolin regulation of endothelial function / R.D. Minshall et al. // Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol. — 2003. — № 285. — P. 1179—1183.

13. Navarro, A., nand-Apte, B., Parat, M.O. A role for caveolae in cell migration / A. Navarro, B. nand-Apte, M.O. Parat // FASEB J. — 2004. — № 18. — P. 1801—1811.

14. Lisanti, M.P. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis / Lisanti, M.P., et al. // Trends Cell Biol. — 1994. — № 4. — P. 231—235.

15. Bucci, M. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation / Bucci, M., et al. // at. Med. — 2000. — № 6. — P. 1362 — 1367.

16. Razani, B. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities / Razani, B. et al. // J. Biol. Chem. — 2001. — № 276. — P. 38121—38138.

17. Schubert, W. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport

Национальная академия наук Беларуси

of albumin in vivo / J Schubert, W. et al. // Biol. Chem. — 2001. — № 276. — P. 48619–48622.

18. Park, D.S. Caveolin-1-deficient mice show accelerated mammary gland development during pregnancy, premature lactation, and hyperactivation of the Jak-2/STAT5a signaling cascade / Park, D.S., et al. // Mol. Biol. Cell. — 2002. — № 13. — P. 3416—3430.

19. Sotgia, F. Caveolin-1-deficient mice have an increased mammary stem cell population with upregulation of Wnt/beta-catenin signaling / Sotgia, F., et al. // Cell Cycle. — 2005. — № 4. — P. 1808—1816.

20. Capozza, F. Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation / F. Capozza, et al. // Am. J. Pathol. — 2003. — № 162. — P. 2029—2039.

21. Williams, T.M., Lisanti, M.P. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis / T.M. Williams, M.P. LisantiAm // J. Physiol Cell Physiol. — 2 005. — № 288. — P. 494—506.

22. Williams, T.M. Combined loss of INK4a and caveolin-1 synergistically enhances cell proliferation and oncogene-induced tumorigenesis: role of INK4a/CAV-1 in mammary epithelial cell hyperplasia / T.M. Williams, et al. // J. Biol. Chem. — 2004. — № 279. — P. 24745—24756.

23. Ross, D.T.Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines / Ross,D.T., et al // Nat. Genet. — 2000. — № 24. — P. 227—235.

24. Liscovitch, M., E.Burgermeister, Neeru J., D.Ravid,M.S.L.T. / M. Liscovitch // Caveolin and Cancer: A Complex RelationshiP. In: Membrane Microdomain Signaling: Lipid Rafts in Biology and Medicine, ed. Mark P.Mattson. — Humana Press Inc., 2005. — P. 161—190.

25. Ravid, D. Caveolin-1 inhibits anoikis and promotes survival signaling in cancer cells / D. Ravid., et al. // Adv. Enzyme Regul. — 2006. — № 46. — P. 163—175.

26. Wiechen, K. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene / K. Wiechen, et al. // Am. J. Pathol. — 2001a. — № 159. — P. 1635—1643.

27. Wiechen, K. Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas / K. Wiechen, et al. // Am. J. Pathol. — 2001 b. — № 158. — P. 833—839.

28. Bayer-Garner, I., Morgan,M., Smoller, B.R. Caveolin expression is common among benign and malignant smooth muscle and adipocyte neoplasms / I. Bayer-Garner, M. Morgan, B.R. Smoller // Mod. Pathol. — 2002. — № 15. — P. 1—5.

29. Yoo, S.H. Expression of caveolin-1 is associated with poor prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the lung / Yoo, S.H., et al // Lung Cancer. — 2003. — № 42. — P. 195—202.

30. Bender, F.C. Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity / Bender, F.C., et al // Cancer Res. — 2000. — № 60. — P. 5870—5878.

31. Shatz, M., Liscovitch, M. Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer / M. Shatz, M. Liscovitch // Int. J. Radiat. Biol. — 2008. — № 84. — P. 177—189.

32. Engelman, J.A., Zhang, X.L., Lisanti, M.P. Genes encoding human caveolin-1 and —2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers / J.A. Engelman, X.L. Zhang, M.P. Lisanti // FEBS Lett. — 1998. — № 436. — P. 403—410.

33. Zenklusen, J.C., Conti, C.J., Green, E.D. Mutational and functional analyses reveal that ST7 is a highly conserved tumor-suppressor gene on human chromosome 7q31 / J.C. Zenklusen, C.J. Conti, E.D. Green // Nat. Genet. — 2001. — № 27. — P. 392—398.

34. Hayashi, K. Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers / K. Hayashi, et al // Cancer Res. — 2001. — № 61. — P. 2361—2364.

35. Chen, S.T. Mutational, epigenetic and expressional analyses of caveolin-1 gene in breast cancers / S.T. Chen, et al // Int. J. Mol. Med. — 2004. — № 14. — P. 577—582.

36. Engelman, J.A., Zhang, X.L., Lisanti, M.P. Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and —2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines / J.A. Engelman, X.L. Zhang, M.P Lisanti. // FEBS Lett. — 1999. — № 448. — P. 221—230.

37. Cui, J. Hypermethylation of the caveolin-1 gene promoter in prostate cancer / J. Cui, et al // Prostate. — 2001. — № 46. — P. 249—256.

38. Galbiati, F. Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism / Galbiati,F., et al. // Mol. Biol. Cell. — 2001. — № 12. — P. 2229—2244.

Национальная академия наук Беларуси

39. Song, K.S. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains / K.S Song, et al. // J. Biol. Chem. — 1996. — № 271. — P. 9690—9697.

40. Sanna, E. Binding of nuclear caveolin-1 to promoter elements of growth-associated genes in ovarian carcinoma cells / E. Sanna, et al. // ExP. Cell Res. — 2007. — № 313. — P. 1307—1317.

41. Quest, A., Gutierrez-Pajares, J.L., Torres, Caveolin-1, an ambiguous partner in cell signaling and cancer / A. Quest, J.L. Gutierrez-Pajares, V. Torres // J. Cell Mol. Med. —2008. — № 272. — P. 7690—7697.

42. Li, L. Caveolin-1 maintains activated Akt in prostate cancer cells through scaffolding domain binding site interactions with and inhibition of serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A / L. Li, et al. // Mol. Cell Biol. — 2003. — № 23. — P. 9389—9404.

43. Torres, V.A. Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein surviving / Torres, V.A., et al. // J. Cell Sci. — 2006. — № 119. — P. 1812—1823.

44. Liu, J. Caveolin-1 expression sensitizes fibroblastic and epithelial cells to apoptotic stimulation / J. Liu et al. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. — 2001. — Vol. 280. — P. 823 — 835.

45. Veldman, R.J. A neutral sphingomyelinase resides in sphingolipid-enriched microdomains and is inhibited by the caveolin-scaffolding domain: potential implications in tumour necrosis factor signaling / R.J. Veldman et al. // Biochem. J. — 2001. — № 355. — P. 859—868.

46. Zundel, W. Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide / W. Zundel, L.M. Swiersz, A. Giaccia // Mol. Cell Biol. — 2000. — Vol. 20. — P. 1507—1514.

47. Podar, K. Essential role of caveolae in interleukin-6- and insulin-like growth factor I-triggered Akt-1-mediated survival of multiple myeloma cells / K. Podar et al. // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 5794—5801.

48. Griffoni, C. Knockdown of caveolin-1 by antisense oligonucleotides impairs angiogenesis in vitro and in vivo / C. Griffoni // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2000. — Vol. 276. — P. 756—761.

49. Liu, J. Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. / J. Liu et al. // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 277. — P. 10661—10668.

50. Woodman, S.E. Caveolin-1 knockout mice show an impaired angiogenic response to exogenous stimuli / S.E. Woodman et al. // Am. J. Pathol. — 2003. — Vol. 162. — P. 2059—2068.

51. Fang, J. PI3K/PTEN/AKT signaling regulates prostate tumor angiogenesis. / J. Fang et al.// Cell Signal. — 2007. — Vol. 19. — P. 2487—2497.

52. Tahir, S.A. Tumor cell-secreted caveolin-1 has proangiogenic activities in prostate cancer / S.A. Tahir, et al. // Cancer Res. — 2008. — Vol. — P. 68, 731—739.

53. Labrecque, L. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol / L Labrecque // Mol. Biol. Cell. — 2003. —Vol. 14. — P. 334—347.

54. Galvagni, F. Vascular endothelial growth factor receptor-3 activity is modulated by its association with caveolin-1 on endothelial membrane / Galvagni, F., et al. // Biochemistry. — 2007. — № 46. — P. 3998—4005.

55. Nevins, A.K., Thurmond, D.C. Caveolin-1 functions as a novel Cdc42 guanine nucleotide dissociation inhibitor in pancreatic beta-cells / A.K. Nevins, D.C. Thurmond // J. Biol. Chem. — 2006. — № 281. — P. 18961—18972.

56. Shakirova, Y. Increased Rho activation and PKC-mediated smooth muscle contractility in the absence of caveolin-1 / Shakirova, Y., et al. // Am. J. Physiol Cell Physiol. — 2006. — № 291. — P. 1326—1335.

57. Lin, M. Regulation of pancreatic cancer cell migration and invasion by RhoC GTPase and caveolin-1 / Lin, M., et al. // Mol. Cancer. — 2005. — № 4. — P. — 21—22.

58. Miotti, S. Simultaneous expression of caveolin-1 and E-cadherin in ovarian carcinoma cells stabilizes adherens junctions through inhibition of src-related kinases / Miotti, S., et al. // Am. J. Pathol. — 2005— Vol. 167. — P. 1411—1427.

59. Salanueva, I.J. Integrin regulation of caveolin function / Salanueva, I.J., et al. // J. Cell Mol. Med. — 2007. — Vol. 11. — P. 969—980.

60. Meyer, A. Integrin-linked kinase complexes with caveolin-1 in human neuroblastoma cells / A. Meyer, et al. // Biochemistry. — 2005. — Vol. 44. — P. 932—938.

61. Chun, J. The subcellular localization control of integrin linked kinase 1 through its protein-protein interaction with caveolin-1 / J. Chun, et al. // Cell Signal. — 2005. — № 17. — P. 751—760.

Дата поступления статьи 12 мая 2008 г.

Национальная академия наук Беларуси

РЕФЕРАТЫ

SUMMURIES

УДК: 575.116.4:314.33

Молекулярно-цитогенетические методы в диагностике синдромальных форм врождённых пороков сердца / В.А. Галаган [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С.7—11. Соавт. : Щербак Ю.А., Цыганкова М.А., Руденко Н.Н., Емец И.Н., Куракова В.В., Кульбалаева Ш.А., Калашникова Р.В., Куркевич А.К.

В Украине врождённый порок сердца (ВПС) является одним из самых распространенных пороков развития - 7—12:1000 новорожденных. Среди этиологических факторов ВПС могут быть как генные, так и хромосомные мутации (количественные и качественные перестройки). Отмечается некоторая специфичность ассоциации определенных генетических синдромов с различными ВПС. В статье рассмотрены клинические данные, акушерский анамнез и молекулярно-цитогенетические методы диагностики микроделеционных синдромов — синдрома 22q11.2 и синдрома Вильямса. Из 11 обследованных пациентов у 4 была выявлена микроделеция по длинному плечу хромосомы 22 (кариотип — 46,XX. ish del (22)(q11.2)(N25-) (G-окраска). Для подтверждающей диагностики микроделеционного синдрома 22q11 целесообразно использовать несколько ДНК-проб на сегмент 22q11. У всех детей с синдромом Вильямса выявлена соответствующая микроделеция — кариотип: 46, XX. ish del (7)(q11.23)(ELN-) (G-окраска).

Ключевые слова: врождённый порок сердца, синдром микроделеции 22q11.2, синдром Вильямса, молекулярно-цитогенетическое исследование.

Molecular-cytogenetic methods used in diagnostics of syndromic forms of congenital heart diseases/ V. Galagan [et al.] // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 7 — 11. Galagan V., Shcherbak U., Tsygankova M., Rudenko N., Emec I., Kurakova V., Kulbalaeva Sh., Kalashnikova R., Kurkevich A.

Congenital heart disease (CHD) is one of the most widespread developmental defects (7-12 :1000 newborns) in the Ukraine. Both gene and chromosome mutations (quantitative and qualitative rearrangements) can occur among ethiological CHD factors. Some specificity of association between certain genetic syndromes and various CHDs is noted. The article concerns clinical data, obstetric history and molecular-cytogenetic methods of diagnosing microdeletion syndromes — syndrome 22q11.2 and Williams syndrome. Of 11 examined patients, microdeletion for a long arm of chromosome 22 (karyotype-46, XX. ish del (22) (q11.2)(N25-) (G-straining) was detected in 4. It is advisable to use several DNA-tests for segment 22q11 for verifying diagnosis of the microdeletion syndrome 22q11. The appropriate microdeletion (karyotype 46, XX. ish del (7) (q 11,23) (ELN-) (G- staining) was detected in all the children with Williams syndrome.

Key words: congenital heart disease, microdeletin syndrome 22q 11.2, Williams syndrome, molecular-cytogenetic study.

УДК 577.175.5

Шкуматов, В.М. Трансгенные микроорганизмы для фармакологических исследований / В.М. Шкуматов // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7, Минск, 2008. С. 12—17.

В работе изложены этапы создания трансгенных дрожжей для первичного фармакологического тестирования лекарств: 1) выбор новых систем вектор-хозяин, 2) уменьшение общего количества модификаций генома дрожжей и ликвидацию побочных продуктов путем выбора соответствующих промоторов и индукторов, 3) использование «молекулярной подстройки» потенциальных лекарственных соединений и пространственной структуры белков-мишеней. При конструировании штаммов использована интеграция в одну стадию множества копий разных гетерологичных генов в «нефункциональных» областях генома дрожжей с получением новых комбинаций экспрессионных кассет. В работе представлены экспериментальные обоснования и данные *in silico* по использованию трансгенных дрожжей *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117α и *Y. lipolytica* DC5 в качестве моделей для первичного отбора соединений, ингибирующих активность P450c17, фермента, играющего важную роль в развитии гормонального канцерогенеза.

Ключевые слова: трансгенные микроорганизмы, промоторы и индукторы, лекарственные соединения, белки-мишени.

Shkumatov, V. Transgenic microorganisms for pharmacological investigations / V. Shkumatov // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 12—17.

The article presents the stages of creating transgenic yeast for primary pharmacological testing of medicines: 1) a choice of new host-vector systems, 2) lowering of the total yeast genome modifications and liquidation of by-products by a choice of suitable promoters and inducers, 3) use of doking for potential medicinal compounds and 3D-structure of targets proteins. Integration of multi-copy heterologous genes in «nonfunctional» areas of yeast genome with obtaining new combinations of expression cassettes is used in designing recombinant microorganisms. Experimental evidence and data in silico for using transgenic yeast *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117α and *Y. lipolytica* DC5 as models for primary screening of compounds, inhibiting activity of P450c17, the enzyme playing the important role in development of hormonal cancerogenesis, are given.

Key words: transgenic microorganisms, promoters and inducers, medicinal compounds, target proteins.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 616-006.88:599

Разработка клеточных тест-систем для создания полинуклеотидных антираковых препаратов / О.В. Квитко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 18—24. Соавт. : Шейко Я.И., Конева И.И., Дромашко С.Е.

Важным аспектом антираковой терапии является гетерогенность популяции раковых клеток. Клеточная фракция, представленная раковыми стволовыми клетками, может отвечать за неограниченную пролиферацию опухоли. Нами разработаны методы анализа клоновой структуры клеточных популяций на основе компьютерной видеомикроскопии живых клеток. Установлено, что часть клеток линии рака легкого А549 формирует клоны, которые после нескольких репликаций стареют и погибают, в то время как другие клетки (иногда небольшая часть) генерируют бесконечно растущие (потенциально бессмертные) клоны. В этой связи особый интерес имеет поиск средств, индуцирующих дифференцировку раковых стволовых клеток в направлении клеточного старения и гибели. Натуральные и синтетические полинуклеотиды (ДНК и РНК) являются перспективным источником для создания антираковых препаратов. Нами обнаружен резко выраженный ингибирующий эффект ДНК эритроцитов цыплят (100 мкг/мл), добавляемой в среду для культивирования клеток HeLa. Представляется целесообразной разработка клеточных систем для подбора полинуклеотидных препаратов (варьирующих по нуклеотидной последовательности и размеру фрагментов), направляющих эпигенетическую изменчивость раковых клеток в сторону пролиферативного старения и гибели.

Ключевые слова: видеомикроскопия живых клеток, раковые стволовые клетки, клеточная дифференцировка, эпигенетическая терапия, полинуклеотидные препараты.

Elaboration of cell test systems for creation of polynucleotide anticancer drugs / O. Kvitko [et al.] // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 18—24. Sheiko Y., Koneva I. , Dromashko S.

Heterogeneity of cancer cell populations is an important issue of anticancer therapy. The particular fractions of cancer cell populations named cancer stem cells can be responsible for the unrestricted proliferation of tumours. We have elaborated the methods of the clonal structure analysis of cell populations based on the computerized videomicroscopy of living cells. It was shown that some cells of the lung cancer cell line A549 give rise to small clones that age and die after several replications while the rest of cells (sometimes a very small proportion of the whole cell culture) generate the indefinitely growing (potentially immortal) clones. In view of such data, search for the means inducing differentiation of cancer stem cells in the direction of cellular ageing and death is of great interest. Natural and synthetic polynucleotides (DNA and RNA) are a promising source for creation of anticancer drugs. We have found a pronounced inhibitory effect of DNA from the chicken erythrocytes (100 mkg/ml) added to the culture medium of HeLa cells. It seems reasonable to elaborate cell test systems for searching the polynucleotide preparations (of various nucleotide sequences and fragment sizes) directing the epigenetic changes of cancer cells toward proliferative ageing and death.

Key words: videomicroscopy of living cells, cancer stem cells, cell differentiation, epigenetic therapy, polynucleotide drugs.

УДК 577.21:575

Кужир, Т.Д. Некоторые аспекты прогноза, профилактики и лечения рака с учетом роли репарации ДНК в канцерогенезе (Обзор) / Т.Д. Кужир // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 25—40.

Представлен обзор литературы о роли репарации ДНК в канцерогенезе. Сведения о различных генах репарации в связи с оценкой онкологического риска систематизированы в таблице. Освещены новые подходы к оценке онкологического риска и терапии различных форм опухолей на основе выявления популяционного полиморфизма по генам репарации ДНК (*BRCA*, *ATM*, *hMSH2* и других). Обсуждается целесообразность изучения и применения антимутагенов в качестве антиканцерогенов.

Ключевые слова: канцерогенез, репарация ДНК, антимутагены, производные 1,4-дигидропиридина.

Kuzhir, T. Some aspects of cancer prognosis, prevention and treatment taking into consideration the role of DNA repair in carceno (Review) / T. Kuzhir // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 25—40.

A review of literature data on the role of DNA repair in carcinogenesis is presented. Information on different DNA repair genes in connection with estimation of the oncological risk is systematized in the table. Novel approaches to the evaluation of oncological risk and therapy of various tumors are elucidated on the basis of revealing population polymorphism of DNA repair genes (*BRCA*, *ATM*, *hMSH2* and others). Expediency of the study and application of antimutagens as anticarcinogens is discussed.

Key words: carcinogenesis, DNA repair, antimutagens, 1,4-dihydropyridine derivatives.

УДК 577.175.5

Влияние тетразолов на взаимоотношение 17α-гидроксилазной и 20(α, β)-гидрокси-стероид-дегидрогеназной активностей в рекомбинантных дрожжах, трансформирующих стероиды / К.А. Фроленков [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 41—44. Соавт. : Фролова Н.С., Рудая Е.В., Шкуматов В.М.

Трансформанты *Saccharomyces cerevisiae GRF18*/YEp5117α, экспрессирующие цитохром Р450с17 из коры надпочечников, осуществляют две последовательные реакции биотрансформации прогестерона: 17α-гидроксилирование

Национальная академия наук Беларуси

(биосинтетическая функция) и 20α-восстановление (инактивирующая функция). Для обоснования применения рекомбинантных микроорганизмов *S.cerevisiae GRF18/*YEp5117α в качестве фармакологической модели было изучено влияние производных арилтетразолов на соотношение биосинтетической и инактивирующей функций рекомбинантных микроорганизмов. Определено, что добавление в среду для культивирования 1-(3-бензилоксифенил)-1Н-тетразола до концентрации 40μМ замедляло скорость биотрансформации прогестерона в 2 раза на начальных этапах (2-3 ч). Уменьшение скорости 17-гидроксилирования может быть обусловлено способностью ингибитора связываться с атомом железа гема фермента.

Ключевые слова: рекомбинантные микроорганизмы, цитохром Р450с17, ингибиторы, молекулярное моделирование, докинг.

Tetrazole influence on the relationship between 17α-hydroxylation and 20(α, β)-hydroxysteroid-dehydrogenation activities in the recombinant yeast transforming steroids / K. Fralenkov [et al.] // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 41—44. Frolova N., Rudaya E., Shkumatov V.

Transformants *Saccharomyces cerevisiae GRF18/*YEp5117α, expressing heterologous cytochrome P450c17 from adrenal cortex, realize two consecutive reactions of progesteron biotransformation, namely, 17α-hydroxylation (biosynthetic function) и 20α-reduction (function of inactivation). The main aim was to prove suitability of *S. cerevisiae GRF18/*YEp5117α as the test-system for pharmacological screening by studying the influence of ariltetrazoles on 17α-hydroxylation and 20(α, β)-hydroxysteroid-dehydrogenation of steroids.

Addition of 1-(3-benzyloxyphenyl) -1H-tetrazolium to the culture medium to the concentration of 40 μM was found to retard the rate of progesterone biotransformation two times at the first stages (2-3 h). Reduction of 17α-hydroxylation rate can be caused by the ability of the inhibitor to be bound with Fe atom of the enzyme heme.

Key words: recombinant microorganisms, cytochrome P450c17, inhibitors, molecular simulation, docking.

УДК 577.175.5

Подавление 3β-О-ацетилирования прегненолона и его производных в рекомбинантных дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/YEp5117α алифатическими спиртами / Я.В. Фалетров [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 45—48. Соавт. : Фролова Н.С., Рудая Е.В., Радюк В.Г., Шкуматов В.М.

Рекомбинантные дрожжи *S.cerevisiae* GRF18/YEp5117α, экспрессирующие Р450с17, были использованы для биотрансформации прегненолона на неселективной полноценной среде YPD. В качестве метаболитов были идентифицированы 17α-гидроксипрегненолон, 3-О-ацетаты прегненолона и 17α-гидроксипрегненолона. 17α-гидроксилирование осуществляется системой «Р450с17 - Р450-редуктаза дрожжей», а реакцию ацетилирования осуществляет ацетил-СоА ацилтрансфераза дрожжей ATF2p. Добавление в среду для культивирования изоамилового спирта (до 0,5 %) приводило к увеличению соотношения 17α-гидроксипрегненолона к 3-О-ацетату прегненолона до 5,3 (в контроле 0,8) после 2 ч биотрансформации 100 мкМ прегненолона при OD_{600} 10. Определено, что уменьшение скорости ацетилирования прегненолона алифатическими спиртами обусловлено конкурентной биотрансформацией стероида и спирта ATF2p. Добавление спиртов не уменьшало активность Р450с17, но значительно подавляло нежелательное ацетилирование стероидов без разрушения гена *ATF2*.

Ключевые слова: Saccharomyces cerevisiae, Р450с17, ацетил-СоА:прегненолон О-ацилтрансфераза, изоамиловый спирт.

Inhibition of pregnenolone and related steroids 3β-O-acetylation in recombinant yeasts *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/YEp5117α by aliphatic alcohols / Y. Faletrov [et al.] // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 45—48. Frolova N., Rudaya E., Radjuk V., Shkumatov V.

Recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/YEp5117α, expressing P450c17, was used for pregnenolone biotransformation on standard YPD media. 17α-hydroxypregnenolone, 3-O-acetates of pregnenolone and 17α-hydroxypregnenolone were detected as metabolites. 17α-hydroxilation was catalyzed by P450c17 – yeast P450-reductase system. Acetylation was catalyzed by yeast ATF2p (acetyl-CoA:pregnenolone O-acyltransferase). When added in cultivation media 0,5 % isoamyl alcohol was capable to increase 17α-hydroxypregnenolone to pregnenolone acetate ratio to 5,3 (the ratio in the control was 0,8) after 2 h biotransformation of 100 μM of pregnenolone at initial OD_{600} 10. Reduction of pregnenolone acetylation rates was due to competition of alcohols tested with the steroid substrate for ATF2p. The alcohols did not alter 17α-hydroxilation rate under experimental conditions and considerably reduced undesirable metabolic way without ATF2 gene distruction.

Key words: Saccharomyces cerevisiae, acetyl-CoA:pregnenolone O-acyltransferase, isoamyl alcohol.

УДК 575.224.6: 577.346

Жизнеспособность и пролиферация клеток млекопитающих под влиянием антимутагена дигидропиридинового ряда / О.В. Даливеля [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 49—54. Соавт.: Савина Н.В., Кужир Т.Д., Бурачевска И., Воеводска М.

Изучено влияние антимутагена дигидропиридинового ряда на жизнеспособность и пролиферативную активность культивируемых клеток млекопитающих. Показано, что исследованное производное 1,4-ДГП в широком диапазоне

Национальная академия наук Беларуси

доз 10^{-9} — 10^{-4} М не обладает цитотоксичностью. Выявлен радиопротекторный эффект этого препарата, который существенно подавлял цитотоксичность ионизирующего излучения в клетках *L5178Y* (*LY-R* и *LY-S*). Исследование препарата с использованием различных подходов показало, что он не влияет на рост и пролиферацию клеток этих линий, так же как и клеток китайского хомячка.

Ключевые слова: линии клеток млекопитающих, жизнеспособность и профилерация клеток, цитотоксичность, ионизирующее излучение, антимутаген, 1,4-дигидропиридин, радиозащитный эффект.

Viability and proliferation of mammalian cells affected by an antimutagen of dihydropyridine series / O. Dalivelya [et al.] // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 49—54. Savina N., Kuzhir T., Buraczewska I., Wojewodzka M.

The effects of an antimutagen of dihydropyridine series on viability and proliferation of cultivated mammalian cells were studied. The 1,4-DHP derivative tested was not shown to reveal cytotoxicity in a wide range of concentrations (10^{-9} — 10^{-4} M). The radioprotective effect of this compound was observed: it reduced cytotoxicity of ionizing radiation in *L5178Y* (*LY-R* and *LY-S*) cells. Using various approaches, it was shown that this antimutagen did not affect cell growth and proliferation in the murine sublines as well as in Chinese hamster ones.

Key words: mammalian cells lines, cell viability, proliferation, ionizing radiation, antimutagen, cytotoxicity, radioprotective effect.

УДК 616.895.8 - 036.17-056.7 (476); 575.174.015.3

Оценка соотношений генотипов матери и ребенка по генам резус фактора в семьях больных шизофренией / Е.А. Аксенова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 55—58 . Соавт. : Покладок Т.Н., Объедков В.Г., Даниленко Н.Г.

Проведена сравнительная оценка соотношений генотипов мать-ребенок по генам резус фактора в родительских семьях больных шизофренией (40 семей) и контрольных семьях здоровых людей (50 семей). Показано, что в семьях с пробандом резус-положительный аллель у больного в сочетании с резус-отрицательным аллелем у его матери встречается в 5,8 раз чаще, чем в здоровых семьях. Молекулярно-генетический анализ факторов, повышающих риск развития шизофрении, проводится в Беларуси впервые.

Ключевые слова: шизофрения, RHD-ген, RHCE-ген, несовместимость генотипов.

The role of maternal-fetal genotype incompatibility at the RHD locus in schizophrenia: family-based study / E. Aksyonova [et al.] // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P . 55—58. Pokladok T., Obyedkov V., Danilenko N.

The comparative evaluation of the RHD-RHCE genotype combination frequency was conducted in 40 patient-mother pairs and 50 control pairs. RHD maternal-fetal genotype incompatible combinations were revealed for patient-mother pairs 5,8 times more often than for the control group. Molecular-genetic analysis of the risk factor for schizophrenia was carried out for the first time in Belarus.

Key words: schizophrenia, RHD-gene, RHCE-gene, Rh incompatibility.

УДК 616.8-056.7-02-053.2

Зимовина, Т.С. Мутации и полиморфные аллели гена арилсульфатазы А при метахроматической лейкодистрофии / Т.С. Зимовина // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7, Минск, 2008. С. 59—64.

Представлены результаты детекции мутаций аллелей псевдодефицита N350S и 1524+95A→ G , а также мутаций P426L и 459+1G>A при метахроматичекой лейкодистрофии. Установлено гетерозиготное носительство мутации P426L гена арилсульфатазы А у пациента с ювенильной формой МЛД. Аллели псевдодефицита найдены у 15 человек контрольной группы. У всех носителей аллелей псевдодефицита уровень ферментативной активности арилсульфатазы А был ниже нормальных значений. Популяционная частота аллелей псевдодефицита среди здоровых жителей Беларуси составила 7,2 %.

Ключевые слова: метахроматическая лейкодистрофия, аллели псевдодефицита, арилсульфатаза А.

Zimovina, T. Mutations and pseudodeficiency alleles of the ASA gene in patients with metachromatic leukodystrophy / T. Zimovina // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 59—64.

The article presents the results of detecting mutations of pseudodeficiency alleles N350S and 1524+95A →G as well as those of P426L and 459+1G>Aat metachromatic leukodystrophy [MLD]. Heterozygous carriage of P426L gene mutation of arylsulfatase A was detected in a patient with a juvenile MLD form. Pseudodeficiency alleles were revealed in 15 persons of the control group. All the carriers of pseudodeficiency alleles have the level of enzymatic activity of arylsulfatase A below the normal values. The population frequency of pseudodeficiency alleles among healthy inhabitants of Belarus was 7,2 %.

Key words: metachromatic leukodystrophy, pseudodeficiency alleles, arylsulfatase A.

Национальная академия наук Беларуси

УДК 616.981.48 — 02:577.21 (476)

Демидович, Т.В. Полиморфизм промотора гена UGT1A1 у белорусских пациентов с синдромом Жильбера / Т.В. Демидович // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 65—70.

Установлена генетическая природа синдрома Жильбера у белорусских пациентов путем анализа промоторной области A(TA)nTAA гена УДФГТ1А1. У 86 % пациентов с неконъюгированной гипербилирубинемией в отсутствие гемолиза выявлено гомозиготное носительство двух дополнительных ТА-повторов. У одного пациента обнаружен (TA)7/8 вариант промоторной области. Согласно результатам популяционного исследования генотип (TA)7/7 встречается у 16 % населения Беларуси.

Ключевые слова: синдром Жильбера, неконъюгированная билирубинемия, промоторная область.

Dzemidovich, T. UGT1A1gene promotor polymorphism in Belorussian patients with Gilbert syndrome / T. Dzemidovich // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 65—70.

The genetic background of Gilbert syndrome in Belorussian patients was established by analysis of the A(TA)nTAA promoter region of the UGT1A1 gene. Different genotypes were identified due to the presence of (TA)6, (TA)7 and (TA)8 repeats. 86 % of patients with unconjugated hyperbilirubinemia without hemolysis appeared to be homozygous for additional TA repeats. (TA)7/8 promotor region variant was found in one patient. Population studies in a group of 100 volunteers revealed the frequency of (TA)7/7 carries as 16 %.

Key words: Gilbert syndrome, unconjugated hyperbilirubinemia, promoter region.

УДК 575.174.015.3:616:572.941.5

Левданский, О.Д.Частоты полиморфных аллелей гена фактора некроза опухолей альфа (*TNFα*) у белорусов / О.Д. Левданский, Н.Г. Даниленко, О.Г. Давыденко // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 71—74.

В статье представлены данные по распространению полиморфных аллелей гена *TNFα* (полиморфизма -308G/A), кодирующего провоспалительный цитокин семейства факторов некроза опухолей. Исследована выборка коренных белорусов в 100 человек. Частоты встречаемости аллелей *TNFα1* и *TNFα2* составили 85 % и 15 % соответственно. Наиболее редкий генотип *TNFα2/TNFα2* в проанализированной популяции распространен с частотой 1 %. Полученные результаты согласуются с данными распределения частот аллелей и генотипов *TNFα* у других народов Европы.

Ключевые слова: фактор некроза опухолей альфа, ген *TNFα*, полиморфизм -308G/A.

Levdanski O. Frequencies of polymorphic alleles of the tumor necrosis factor alpha (*TNFα*) gene in Belorussians / O. Levdanski, N. Danilenko, O. Davydenko // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 71—74.

The frequencies of polymorphic alleles of the *TNFα* gene (-308G/A polymorphism), encoding proinflammatory cytokine included in the family of tumor necrosis factors in 100 native Byelorussians were analyzed. The obtained frequencies of *TNFα1* and *TNFα2* alleles were 85 % and 15 % respectively. The rarest genotype *TNFα2/TNFα2* was found in 1 % of the analyzed individuals. The results obtained are in agreement with the data of frequency distribution of *TNFα* alleles and genotype in other European peoples.

Key words: α-factor of tumor necrousis, *TNFα* gene, polymorphism-308G/A.

УДК 574.3:575.24/.25:616.151.5

Гончар, А. Л. Молекулярно-генетический анализ полиморфизмов Thr312Ala и Val34Leu как факторов риска инфаркта миокарда / А. Л. Гончар, И. Б. Моссэ, Д. В. Савчин // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 75—79.

В работе исследована роль полиморфных вариантов Thr312Ala α-цепи фибриногена и Val34Leu фактора XIII свертываемости крови в генетической предрасположенности к инфарктам миокарда. Для определения аллелей применялись методы полимеразной цепной реакции. В качестве биологического материала для исследования была использована ДНК, выделенная из лейкоцитов крови или экстрагированная из пятен крови, высушенных на специальных бланках. Распределение аллелей Thr312Ala исследовано в 127 образцах крови пациентов случайной выборки и в 53 образцах больных, перенесших инфаркт миокарда. Распределение аллелей Val34Leu исследовано в 109 образцах контрольной группы и в 74 образцах больных, перенесших инфаркт миокарда. Показано, что частота встречаемости аллеля А полиморфизма Thr312Ala в группе больных в 2,3 раза выше, чем в контрольной выборке. Полученные данные являются дополнительным свидетельством влияния данного полиморфизма на генетическую предрасположенность к инфаркту миокарда. В то же время частота встречаемости альтернативного аллеля полиморфизма Val34Leu существенно не различалась у больных с инфарктами миокарда и в контрольной группе.

Ключевые слова: полиморфизм генов, инфаркт миокарда, ДНК-диагностика, фибриноген.

Национальная академия наук Беларуси

Gonchar A. Molecular-genetical analysis of Thr312Ala and Val34Leu polymorphisms as risk factors of myocardial infarction / A. Gonchar, I. Mosse, D. Savchin // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 75—79.

The role of Thr312Ala and Val34Leu polymorphisms in genetic predisposition to myocardial infarction was investigated. The methods of polymerase chain reaction were used to determine both polymorphisms. DNA extracted from lymphocytes or dried bloodspots was used as matrix for PCR. Thr312Ala allele distribution was determined in 127 samples of the control group and in 53 samples of patients with myocardial infarction. Val34Leu allele distribution was determined in 109 samples of the control group and in 74 samples of patients with myocardial infarction. The occurrence frequency of A allele of Thr312Ala polymorphism in the group of patients was shown to be 2.3 times as high as in the control group. The data obtained are an additional evidence of the polymorphism influence on genetic predisposition to myocardial infarction. At the same time the occurrence frequency of the alternative allele of Val34Leu polymorphism did not differ substantially between the group of patients with myocardial infarctions and the control one.

Key words: gene polymorphism, myocardial infarction, DNA-diagnosis, fibrinogen.

УДК 576.54+577.21

Морозик, П.М. Роль гормона мелатонина в регуляции межклеточной передачи информации / П.М. Морозик, И.Б. Моссэ // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 80—85.

Данная работа посвящена изучению механизмов и природы феномена передачи информации от облученных клеток необлученным (радиационно-индуцированного «байстэндер» эффекта (РИБЭ), при котором повреждения возникают в интактных клетках. Изучение сигналов, возникающих в аффектированной клетке, имеет большое значение для понимания механизмов ответа клетки на повреждающее воздействие. Исследование проводили в культивируемых клетках человека (кератиноцитах). РИБЭ индуцировали переносом питательной среды от облученных клеток необлученным. В качестве модификатора использовали нейрогармон мелатонин. Анализ проводили с помощью колониеобразующего и микроядерного тестов. Результаты показали, что мелатонин способен уменьшать «байстэндер» эффект. Учитывая высокую антирадикальную активность модификатора, можно предположить, что в механизме РИБЭ существенную роль играют свободнорадикальные процессы.

Ключевые слова: мелатонин, «байстэндер» эффект, кератиноциты человека, нейрогормон.

Marozik, P. The role of hormone melatonin in regulation of intercellular transfer of information / P. Marozik, I. Mosse // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 80—85.

The purpose of this project was to study the mechanisms and nature of the information transfer phenomenon of cellular damage from irradiated cells to non-irradiated cells (radiation-induced bystander effect (RIBE)). The study of the signals appearing in affected cell is of great importance for understanding mechanisms of cellular response to damaging influence. The study was performed using human cell culture (keratinocytes). RIBE was induced by transfer of nutrient medium from irradiated cells to non-irradiated. Neurohormone melatonin was used as modifying agent. Analysis was performed using clonogenic and micronuclei assays. The result have shown that melatonin was able to partially neutralize bystander factors. Taking into consideration the high radical scavenging activity of the modifying agent, it is possible to propose that RIBE factors have free radical nature.

Key words: melatonin, bystander effect, human keractinocytes, neurohormone.

УДК 577.21:575

Индуцированная геномная нестабильность как фактор заболеваемости. оценка целостности генома человека методом ДНК-комет / Р.И. Гончарова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 86—92. Соавт. : Кужир Т.Д., Савина Н.В., Смаль М.П.

В статье дано представление о феномене геномной нестабильности и освещена его связь с заболеваемостью населения. Представлены экспериментальные результаты по оценке целостности генома методом ДНК-комет в двух контрольных группах здоровых доноров (20 и 10 образцов периферической крови, соответственно). Установлено, что фоновый уровень повреждений ДНК колеблется от 10 до 20 a.u. Оценена *in vitro* чувствительность генома здоровых доноров к окислительному стрессу, вызванному пероксидом водорода при концентрации 100 мкМ. Установлено, что средний уровень индуцированных окислительных повреждений ДНК в первой группе составлял 73,12±3,91 a.u., а во второй 100,78±10,60. Выявлена неоднородность выборки обследованного здорового населения, свидетельствующая об индивидуальной чувствительности к мутагенному воздействию. Анализ кинетики элиминации повреждений ДНК в зависимости от времени инкубации изолированных лимфоцитов показал, что репарация ДНК наиболее эффективна в течение первых 30 минут после индукции окислительного стресса. Полученные количественные оценки будут использованы как базовые критерии для выявления геномной нестабильности в группах риска.

Ключевые слова: геномная нестабильность, метод ДНК-комет, лимфоциты периферической крови человека

Национальная академия наук Беларуси

Induced genome instability as a morbidity factor. Evaluation of genome integrity by Comet assay / R. Goncharova [et al.] // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P . 86—92. Kuzhir T.D., Savina N.V., Smal M.P.

Genome instability conception as well as the relationship between this phenomenon and morbidity is analyzed. Experimental results on estimation of genome integrity by the Comet assay in two control groups of healthy donors are presented. The DNA damage background level was established to vary from 10 to 20 a.u. The average level of DNA damage induced by hydrogen peroxide at the dose of 100 μM was 73,12±3,91 a.u. in the first group and 100,78±10,60 a.u. in the second group. Observed heterogeneity of samples was due to individual sensitivity to mutagenic effects. Kinetics of DNA damage elimination depending on terms of lymphocytes incubation after their mutagenic treatment showed the most efficient DNA repair during the first 30 minutes after the oxidative stress induction. The values obtained will be used as the basal criteria for revealing genome instability in the risk groups.

Key words: genome instability, DNA- Comet assay, lymphocytes of human peripheral blood.

УДК 616.831-056.7-02:616.89-008.441.42

Скугаревский, О.А. Фенотипическая реализация полиморфизма гена нейротропного фактора мозга (BDNF) при нарушениях пищевого поведения / О.А. Скугаревский, Н.Г. Даниленко // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 93—99.

Проявления нарушений пищевого поведения (НПП) (нервная анорексия, нервная булимия) находятся под значимым контролем генетических факторов. Ранее было показано, что экспрессия BDNF-гена (brain-derived neurotrophic factor) определяет способности адаптации организма к средовым влияниям, связана с механизмами обеспечения энергетического гомеостаза, ответственна за особенности психопатологических проявлений ряда психических расстройств. В сравнительном исследовании 59 больных НПП (контрольная группа - 46 человек) изучена взаимосвязь полиморфизма гена нейротропного фактора мозга по однонуклеотидным заменам BDNF-гена (-270C>T и Val66Met) и своеобразия психопатологических проявлений НПП. Показано, что для больных НПП в белорусской популяции характерна меньшая плотность аллеля Met66 по сравнению с большинством исследованных европейских стран. Для носителей -270T аллеля свойственна более низкая величина индекса массы тела накануне начала расстройства. Генотип Val66Met у больных НПП сопряжен с большей тяжестью ритуалов в структуре дезадаптивного пищевого поведения, меньшей мотивацией к изменениям и большей тяжестью сопутствующей психопатологической симптоматики.

Ключевые слова: анорексия, булимия, генетический полиморфизм, точечные однонуклеотидные замены нейротропный фактор мозга.

Skugarevsky, O. Phenotypic realization of BDNF-gene polymorphism in eating behavior disorders / O. Skugarevsky, N. Danilenko // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 93—99.

Eating behavior disorders' (EBD) (anorexia nervosa, bulimia nervosa) are under strong genetic influence. Previously it has been pointed out that BDNF-gene (brain-derived neurotrophic factor) expression determines organism adaptation properties to the environmental influences, processes of energy homeostasis regulation and peculiarities of psychopathological features of certain psychiatric disorders. In comparative study (59 ED patients and 46 sex and age matched controls) interrelations between SNP of BDNF-gene (-270C>T and Val66Met) and psychopathological phenomena of EBD have been assessed. Low density of Met66 in Belorussian EBD-patients in comparison with the majority of European countries studied has been pointed out. Eating disorders' -270T carriers have lower body mass index before EBD-manifestation. Genotype Val66Met in EBD patients is interrelated with higher behavioral rituals severity, lower motivation to changes and more intensity of concomitant psychopathological features.

Key words: anorexia, bulimia, genetic polymorphism, point mononucleotide substitutions, brain neurotrophic factor.

УДК 616.24-006-07:577.21+575.1/.2´316

Полиморфизм некоторых генов биотрансформации ксенобиотиков и их влияние на предрасположенность к мультифакториальной патологии / Е.П. Михаленко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С.100—104. Соавт. : Чакова Н.Н., Полонецкая С.Н., Чеботарева Н.В., Дромашко С.Е., Крупнова Э.В.

В работе анализируется роль генетического полиморфизма ферментов биотрансформации в развитии мультифакториальной патологии.

Ключевые слова: генетический полиморфизм; гены биотрансформации, мультифакторные заболевания.

Polymorphism of some biotransformation genes of xenobiotics and their influence on predisposition to multifactorial pathology / E. Mikhalenko [et al.] // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 100—104. Chakova N., Polonetskaya S., Chebotareva N., Dromashko S., Krupnova E.

The role of genetic polymorphism of biotransformation enzymes in development of multifactorial pathology is analyzed in the research work.

Key words: genetic polymorphism, biotransformation genes, multifactorial diseases.

Национальная академия наук Беларуси

УДК: 575.224.4/575.224.6

Результаты исследований генопротекторной активности одного из перспективных производных 1,4-дигидропиридина с использованием клеток человека *in vitro* / Н.И. Рябоконь [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 105—109. Соавт. : Никитченко Н.В., Даливеля О.В., Гончарова Р.И.

В данной работе представлены наши данные о высокой генопротекторной эффективности и низкой цитотоксичности одного из перспективных препаратов из серии 1,4-дигидропиридина для лимфоцитов здоровых доноров *in vitro.* Полученные данные дополняют наши предыдущие исследования, проведенные на различных линиях клеток человека, и предоставляют важную информацию для дальнейших исследований производных 1,4-дигидропиридина в качестве лекарственных и профилактических средств против ряда заболеваний.

Ключевые слова: производные 1,4-дигидропиридина, клетки человека, лимфоциты, генопротекторная активность, цитотоксичность.

Results of studies on genoprotective activity of a promising compound of 1,4-dihydropyridine derivatives using human cells *in vitro* / N. Ryabokon [et al.] // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 105—109. Nikitchenko N., Dalivelya O., Goncharova R.

Here we report the data on high genoprotective efficiency and low cytotoxicity of a promising compound of the 1,4-dihydropyridine series for lymphocytes of healthy donors *in vitro*. These data complement our previous studies carried out in various lines of human cells and they provide important information for further research of 1,4-dihydropyridine derivatives as therapeutic or prophylactic compounds against various diseases

Key words: 1,4-dihydropyridine derivatives, human cells, lymphocytes, genoprotective activity, cytotoxicity.

УДК 616.8-056.7-071

Лихачев, С.А. Организация диагностики и лечения наследственных неврологических болезней: основные проблемы современного этапа / С.А. Лихачев, И.В. Плешко // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7, Минск, 2008. С. 110—114.

Рассматриваются современные проблемы клинической и молекулярно-генетической диагностики и лечения наследственных заболеваний нервной системы. Описываются характерные особенности, отличающие нейрогередитарные заболевания от другой патологии нервной системы. Эпидемиология данных заболеваний в нашей республике не изучена, что препятствует организации профилактики и современного лечения.

Ключевые слова: наследственные болезни нервной системы, диагностика

Likhachev, S. Organization of diagnostics and treatment of hereditary neurologic diseases: basic problems of the present stage / S. Likhachev, I. Pleshko // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 110—114.

The article concerns current problems of clinical and molecular genetic diagnostics and treatment of hereditary neurologic diseases. Characteristics features, distinguishing neurohereditary diseases from the other pathology of nervous system, are described. Epidemiology of the given diseases was not studied in our republic that hinders organization of prophylaxis and advanced treatment.

Key words: neurology, hereditary neurologic diseases, diagnostics.

УДК: 575.174.015.3:616(476)

Исследование генетических факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний в Беларуси / Л. Н. Сивицкая [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 115—122. Соавт. : Кушнеревич Е. И., Даниленко Н. Г., Давыденко О. Г.

В статье представлены данные по исследованию распространения аллелей и генотипов риска трех генов-кандидатов сердечно-сосудистых заболеваний у белорусов — эндотелиальной синтазы окиси азота (*eNOS*), липопротеинлипазы (*LPL*) и аполипопротеина Е (*apoE*). Выявлен градиентный характер распределения аллелей ε4 гена *apoE* и *447Ter* гена *LPL* в Беларуси: их частоты увеличиваются с северо-запада на юго-восток страны. Средние значения встречаемости аллелей риска составили 18,2 % (*4a* гена *eNOS*), 8,2 % (*ε4* гена *apoE*) и 93,1 % (*447Ser* гена *LPL*).

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания, генетический полиморфизм, эндотелиальная синтаза окиси азота, липопротеинлипаза, аполипопротеин Е.

Study of genetic risk factors of cardiovascular diseases in Belarus / L. Sivitskaya [et al.] // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 115—122. Kushnerevich A., Danilenko N., Davydenko O.

Risk allele and genotype prevalence of *eNOS, LPL* and *apoE* gene were studied in Belarus population as a genetics factor of cardiovascular diseases. Geographic gradient was found in distribution of *ε4* (*apoE*) and *447Ter* (*LPL*) alleles: the frequencies are increased from north-west to south-east of Belarus. The average rate of risk alleles were: 18,2 % (*4a, eNOS*), 8,2 % *(ε4, apoE*) и 93,1 % (*447Ser, LPL*).

Национальная академия наук Беларуси

Key words: cardiovascular diseases, genetic polymorphism, endothelial nitric oxide synthase, lipoprotein lipase, apolipoprotein E

УДК 616.8+616.74-009.86

Якуц, О.А. Торсионные дистонии: классификация, клинические проявления, молекулярно-генетическая природа и диагностика / К.А. Моссэ, И.В. Плешко // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 123—127.

Торсионные дистонии представляют собой гетерогенную группу заболеваний. За их возникновение отвечают 13 генетических локусов. Основной ген дофа-независимой торсионной дистонии - DYT1. Наиболее частой причиной возникновения дистонии является делеция трех нуклеотидов GAG в 946-м положении 5-го экзона гена. Для диагностики заболевания отработаны методы идентификации делеции с применением автоматического капиллярного электрофореза. По результатам исследования ДНК от 42 больных и членов их семей делеция была выявлена у одного пациента с генерализованной торсионной дистонией.

Это первый случай установления диагноза дофа-независимой торсионной дистонии в Беларуси с использованием ДНК-анализа. Применение молекулярно-генетических методов диагностики в дальнейшем будет способствовать уточнению симптоматической картины заболевания, а возможность раннего выявления позволит начинать своевременную профилактику и лечение.

Ключевые слова: торсионная дистония, делеция, DYT1

Torsion dystonia: classification, clinical manifestation, molecular-genetic nature and diagnostics.

Yakuts O., V. Torsion dystonia: classification, clinical manifestation, molecular-genetic nature and diagnostics / K. Mosse, I. Pleshko // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk. 2008. P. 123—127.

Torsion dystonias are the heterogenous group of disorders. Thirteen loci are responsible for their origin. Basic gene of the dopa-unresponsible torsion dystonia is DYT1. The most frequent cause of dystonia type is deletion of the 3 nucleotides GAG in 946 location of the 5th exon of the DYT1 gene. We used automatic capillary electrophoresis for the identification of deletion and diagnostics of the disorder. Forty-two patients and their family members were screened and one deletion was found in a patient with generalized dystonia.

It is the first case of ascertainment of dopa-unresponsible torsion dystonia diagnosis by DNA-analysis in the Republic of Belarus. Further application of molecular-genetic analysis will contribute to more accurate definition of symptomatic image of the disorder, and scope for early diagnosis will permit the timely preventive measures and treatment.

Key words: torsion dystonia, deletion, DYT1

УДК 616.69:612.6.05 - 71

Моссэ, Н.И. Аллельные варианты политимидинового тракта гена ТРБМ и их роль в нарушении репродуктивной функции у мужчин / Н.И. Моссэ, К.А. Моссэ // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 128—132.

Для оценки вклада генетических факторов в нарушение репродуктивной функции у мужчин и внедрения методов молекулярно-генетической диагностики выполнен анализ полиморфизма интрона 8 гена ТРБМ в образцах ДНК от пациентов с азооспермией и в контрольной группе. Распределение аллелей исследовано в 102 хромосомах от пациентов и 240 нормальных хромосомах. Установлено, что частота аллеля 5T, вызывающего появление аномальных транскриптов гена ТРБМ и снижающего продукцию нормального белка, в группе пациентов с бесплодием составляет 12,7 %, что в три раза выше, чем в контрольной группе ($\chi 2=8,4$, $p<0,005$). У двух пациентов с азооспермией было установлено гомозиготное носительство данного аллеля. Показано, что результатом такого лабораторного исследования может быть постановка или уточнение диагноза, рекомендации по использованию искусственных методов оплодотворения, оценка риска передачи потомству генетических нарушений репродуктивной функции и сопутствующей наследственной патологии.

Ключевые слова: азооспермия, муковисцидоз, бесплодие.

Mosse, N. The poly-t tract allelic variants in intron 8 of the CFTR gene and their role in male infertility / N. Mosse, K. Mosse // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 128—132.

An important percentage of severe male fertility problems is related to the abnormalities of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene including the poly-T tract located in intron 8. Its 7T and 9T variants generate a predominantly normal CFTR transcript, whereas the 5T variant affects splicing efficiency and generates exon 9-skipped transcripts that engender an anomalous protein product. To assume the diagnostic relevance of the poly-T tract analysis, we study a group of azoospermic men with primary testicular failure and the control group. A strong association was found

Национальная академия наук Беларуси

between 5T variant of the IVS8-T polymorphism and male infertility ($\chi 2=8,4$, $p<0,005$). This analysis is recommended to assist the genetic consultation of infertile couples who have chosen to be treated by assisted-fertilization methods such as ICSI.

Key words: azoospermia, mucoviscidosis, infertility.

УДК 547.586.2:616.15:577/21 (476)

Цукерман, Ю.В. Мутации гена ФАГ у белорусских пациентов с фенилкетонурией / Ю.В. Цукерман, К.А. Моссэ // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 133—136.

Фенилкетонурия (ФКУ) является одним из наиболее распространенных наследственных заболеваний (частота 1:6000 новорожденных) в популяции Беларуси. Для определения распространенности мутаций гена ФАГ наиболее характерных для славянских популяций у больных ФКУ в Беларуси выполнен анализ пяти мутаций: R158Q, R261Q, Y414C, IVS11-10g>a и IVS12nt1. Для выявления использован метод ПДРФ. В общей сложности анализ 5 мажорных мутаций позволил идентифицировать 57 генных дефектов у 51 больного ФКУ, что увеличило процент выявленных мутаций (с учетом R408W) до 76,7 %. У 6 пробандов были определены обе неизвестные ранее мутации, и у 34 вторая неизвестная мутация в компаунде с R408W. Таким образом, возможность прямой пренатальной диагностики появилась дополнительно для 40 семей с высоким риском ФКУ. Установлено, что мутации R158Q, R261Q, и IVS12nt1 являются диагностически значимыми для популяции Беларуси и их поиск у больных ФКУ является целесообразным для верификации диагноза и проведения прямой пренатальной диагностики.

Ключевые слова: ФКУ, мутационный анализ, ген ФАГ.

Tsukerman, J. Mutations of PAH gene in Byelorussian patients with PKU / J. Tsukerman, K. Mosse // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 133—136.

Phenylketonuria (PKU), caused by a deficiency of phenylalanine hydroxylase (PAH), is one of most common hereditary diseases. PKU is autosomal recessive mendelian trait with incidence of 1:6000 of newborns in Belarus. We examined 255 unrelated PKU patients diagnosed by the neonatal screening program for the presence of 5 PAH mutations with high prevalence in European population: R261Q, R158Q, IVS10nt11, Y414C, and IVS12nt1. Nucleotide changes were analyzed by RFLP method. Totally 57 mutations in 51 patients were detected, and now the detection rate of PKU alleles in Belarus is 76,7 % (391/510) including major R408W. Identification of mutation in proband also increased the number of families fully informative for the prenatal diagnosis of the disease.

Key words: phenylketonuria (PKU), mutation analysis, PAH-genes.

УДК 612.6.05-008.9-053.2

Гриценко, О. Н. Роль генетических дефектов системы комплемента в развитии гемолитико-уремического синдрома / О. Н. Гриценко // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 137—142.

Гемолитико-уремический синдром (ГУС) является заболеванием, характеризующимся триадой основных клинических проявлений: почечная недостаточность, микроангиопатическая гемолитическая анемия, тромбоцитопения. На сегодняшний день в Республике Беларусь гемолитико-уремический синдром является одной из основных причин возникновения острой почечной недостаточности у детей. Современная классификация выделяет две формы ГУС: типичную форму гемолитико-уремического синдрома, ассоциированную с диареей (ГУС-Д+) и спорадическую либо атипичную форму, не ассоциированную с диареей (ГУС-Д-). Наследственные дефекты компонентов комплемента: фактора Н, фактора I, мембранного кофакторного протеина представляются одним из основных этиологических факторов развития ГУС.

Ключевые слова: гемолитико-уремический синдром, фактор комплемента Н, мембранный кофакторный протеин, фактор I.

Gritsenko, O. Genetic abnormalities in the complement system in pathogenesis of hemolytic-uremic syndrome / O. Gritsenko // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 137—142.

Hemolytic-uremic syndrome (HUS) is a clinical syndrome characterized by progressive renal failure associated with microangiopathic hemolytic anemia and thrombocytopenia. HUS is the most common cause of acute renal failure in children in Belarus. It is caused by thrombi of platelets formed under on the microcirculation of the kidney. HUS can be classified as classical associated with diarrhoea (D+HUS), and non-diarrhoea associated (D-HUS). Recent data suggest genetic abnormalities in the complement regulatory proteins: complement factor H, membrane cofactor protein and factor I in pathogenesis of HUS.

Key words: hemolytic-uremic syndrome, complement factor H, membrane cofactor protein, factor I

УДК (57.017.6+576.385.5):575.155

Исследование роли аномальных митозов в процессе раковой трансформации / Я.И. Шейко [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 143—147. Соавт. : Квитко О.В., Конева И.И., Дро-

Национальная академия наук Беларуси

машко С.Е.

С помощью компьютерной видеомикроскопии прижизненно изучались клеточные культуры фибробластов человека и мыши, а также иммортальная линия из эмбриона мыши. Получены данные о более надежной системе ингибирования делений крупных клеток у человека по сравнению с мышью. Отмечено, что в иммортальной культуре происходят асимметричные биполярные и трехполюсные деления, причем эти аномальные деления нередко приводят образованию жизнеспособных клеток, способных формировать активно пролиферирующие клоны. Полученные данные указывают на то, что один из путей онкогенной трансформации клеток может осуществляться посредством хромосомной нестабильности, связанной с аномалиями процесса митоза.

Ключевые слова: видеомикроскопия, раковая трансформация, иммортализация.

Study of the anomalous mitosis involvement in cancer transformation / Y. Sheiko [et al.] // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 143—147, Koneva I., Kvitko O., Dromashko S.

Human and murine fibroblasts' cell cultures as well as the immortal cell line from mouse embryo were studied by means of computer microscopy of living cells. The data obtained in favor of the relatively more reliable system of inhibiting mitotic divisions of large cells in man compared to mouse. It was shown that symmetric bipolar and three-polar divisions happen in the immortal cell line. The anomalous mitoses often give birth to viable cells that form the actively proliferating clones. These data suggest that one of the ways of oncogenic transformation may be realized by means of chromosomal instability connected with anomalies in the mitotic process.

Key words: videomicroscopy, cancer transformation, immortalization.

УДК 614.876:616-008

Мельнов, С.Б. Молекулярно-генетические механизмы формирования геномной нестабильности при низкодозовых воздействиях у человека / С.Б. Мельнов, Ю.В. Малиновская // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 148—156.

В статье анализируется состояния генома человека в отдаленный период после мутагенного воздействия. Приводятся данные свидетельствующие о формировании у ликвидаторов симптомов синдрома геномной нестабильности. Выдвигается предположение о роли в формировании этого синдрома кластогенных факторов.

Ключевые слова: синдром геномной нестабильности, кластогенные факторы, хромосные абберации.

Melnov, S. Molecula-genetoc mechanisms of genomic instability for humans affected by low dose irradiation / S. Melnov, Yu. Malinovskaya // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 148—156.

In article we analyzed human genome state after irradiation during long period of time. Data confirming the symptoms of genomic instability syndrome in somatic tissues of clean-up workers were summarized. The hypothesis of clastogenic factor role in genomic instability syndrome is under discussion

Key words: genomic instability syndrome, clastogenic factors, chromosome aberrations.

УДК 577.218:616-006

Архипова, К.А. Роль кавеолина-1 в канцерогенезе / К.А. Архипова, А.Н. Тележкина, И.Б. Зборовская // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. Т. 7. Минск, 2008. С. 157—168.

Кавеолин-1 относится к семейству белков кавеолинов и является принципиальным структурным компонентом кавеол. Кавеолин-1 участвует в процессах эндоцитоза, липидном обмене, а также в регуляции внутриклеточных сигнальных путей. Изучение роли кавеолина-1 в канцерогенезе весьма актуально, поскольку его влияние на опухолевую трансформацию очевидно, но механизмы этого воздействия остаются во многом спорными или не исследованными. В данном обзоре представлены современные данные о роли кавеолина-1 в нормальной жизнедеятельности клетки и его возможном влиянии на процессы опухолевой трансформации.

Ключевые слова: кавеолин-1, кавеолы, канцерогенез, опухолевая трансформация клетки.

Arkhipova, K. The role of cabeolin-1 in carcinogenesis / K. Arkhipova A. Telezhkina, I. Zborovskaya // Molecular and Applied Genetics : Proceedings. Vol. 7. Minsk, 2008. P. 157—168.

Caveolin-1 belongs to the family of caveolin proteins and is a principal structural component of caveolae. Caveolin-1 is involved in the processes of endocytosis, lipide exchange as well as in regulation of intracellular signal pathways. Study on the role of caveolin-1 in carcinogenesis is quite vital since its influence on tumor transformation is evident but the mechanisms of this effect remain to a large extent open to argument or unstudied. The given article presents up-to-date evidence of the caveolin-1 role in normal vital functions of cell and its potential influence on the process of tumor transformation.

Key words: caveolin-1, caveolae, carcinogenesis, cell's tumor transformation.

Национальная академия наук Беларуси

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЬИ

Статьи должны быть написаны в сжатой и ясной форме и содержать:

• соответствующий индекс универсальной десятичной классификации литературы (УДК);

• название на русском и английском языках;

• инициалы и фамилии авторов на русском и английском языках;

• полное название учреждений, в которых выполнялось исследование и их почтовые адреса;

• ключевые слова (3…5 слов);

• аннотацию на русском и английском языках (100-150 слов). Аннотация должна ясно излагать содержание статьи и быть пригодной для опубликования в аннотациях к журналам отдельно от статьи;

• текст статьи (стандартизировать, используя подзаголовки «ВВЕДЕНИЕ», «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ», «РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ», «ЗАКЛЮЧЕНИЕ»);

• список использованных источников (оформляется в соответствии с Правилами ВАК, Приложение 2);

• дату поступления статьи в редакцию.

Объем статьи должен составлять не менее 14 000 знаков, включая пробелы, до 10—12 страниц. Последняя страница статьи должна быть заполнена не менее чем на 4/5(!). После распечатки статья должна быть вычитана автором (авторами). На последней ее странице должна(ы) быть подпись(и) автора(ов). Текст статьи идентичного содержания представляется в электронном виде (по e-mail или на дискете) и на бумажном носителе в 2 экз. В виде отдельного документа представляются краткие сведения о каждом из авторов, включающие фамилию, имя, отчество, год рождения, сведения об образовании, служебные адреса, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность, область научных интересов. Необходимо представить АКТ ЭКСПЕРТИЗЫ о возможности опубликования открытой печати (для статей) и РЕЦЕНЗИЮ на статью.

1. Сдаваемый документ должен быть представлен в электронном виде в формате MS-Word. Название файлов — фамилия первого автора латинскими буквами.

2. Формат бумаги А4 (297 х 210 мм), ориентация — книжная.

3. Поля: верхнее — 2,5 см, нижнее - 2,5 см, левое — 2, 5 см, правое -2,5 см.

4. Основной текст статьи набирается шрифтом Times New Roman, размером 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца.

5. Автоматическая расстановка переносов обязательна.

6. Название статьи набирать ПРОПИСНЫМИ БУКВАМИ полужирным начертанием шрифта по центру. Переносы в заголовках не допускаются.

7. Все таблицы, содержащиеся в документе, должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора MS-Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах. Таблицы и графики должны быть пронумерованы и иметь названия. Не допускается размещение таблиц и рисунков в конце статьи (непосредственно перед списком литературы).

8. Вставка в текст символов (например, β, €) производится только через опцию «Вставка\Символ». Выключку вверх и вниз (C^2, C_4) выполнять через меню «Формат\Шрифт\Верхний индекс\Нижний индекс». Греческие символы должны быть прямыми, латинские буквы набираются *курсивом*. Математические формулы (lim, sum, sin, и т. д.) и цифры набираются прямым начертанием.

9. Печатать в сложных словах дефис (минерал-индикатор, К-пространство). Тире отбивают с обеих сторон неразрывным пробелом как знак препинания между словами: система «человек — машина», «май — июнь». Тире между цифрами, напр., 20—30 чел. - не отбивается.

10. Кавычки по всему тексту должны быть одного «рисунка». Кавычки не отбивают от заключенных в них слов.

11. При подготовке к печати графиков, блок-схем, диаграмм, файлы должны быть поименованы таким образом, чтобы было понятно, к какой статье они принадлежат и какими по порядку рисунками статьи являются. Графики должны иметь толщину всех линий не менее 0,2 пункта для четкого воспроизведения. Все надписи на рисунках должны быть набраны на компьютере и сгруппированы с рисунком, не допускается использование сканированного текста.

12. Необходимо предоставить электронные файлы фотоматериалов, а также распечатки лазерным принтером всех иллюстраций на листе формата А4. Отсканированные фотоиллюстрации серой, черно-белой цветовой модели должны иметь разрешение 600 dpi и формат TIFF.

13. Список цитированных источников располагается в конце текста, ссылки нумеруются согласно порядку цитирования в тексте. Порядковые номера ссылок д.б. написаны внутри квадратных скобок. (напр.: [1]).

Национальная академия наук Беларуси

Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 7

Ответственный за выпуск *И.В. Широкая*
Переводчик *Г.А. Мартысь*
Верстка *М.В. Сергеева*
Технический редактор *В.Г. Гавриленко*

Подписано в печать 01.09.2008. Формат 60x84 1/8 Бумага офсетная. Гарнитура Roman.
Печать цифровая.Усл. печ. л. 22,5. Уч.изд. л. 22,7. Тираж 100 экз. Заказ №628
ИООО «Право и экономика» Лицензия ЛИ №02330/0056831 от 01.04.2004.
220072 Минск Сурганова 1, корп. 2. Тел. 284 18 66, 8029 684 18 66
Отпечатано на настольно - издательской системе XEROX в ИООО «Право и экономика»
Оригинал-макет подготовлен ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».

Национальная академия наук Беларуси