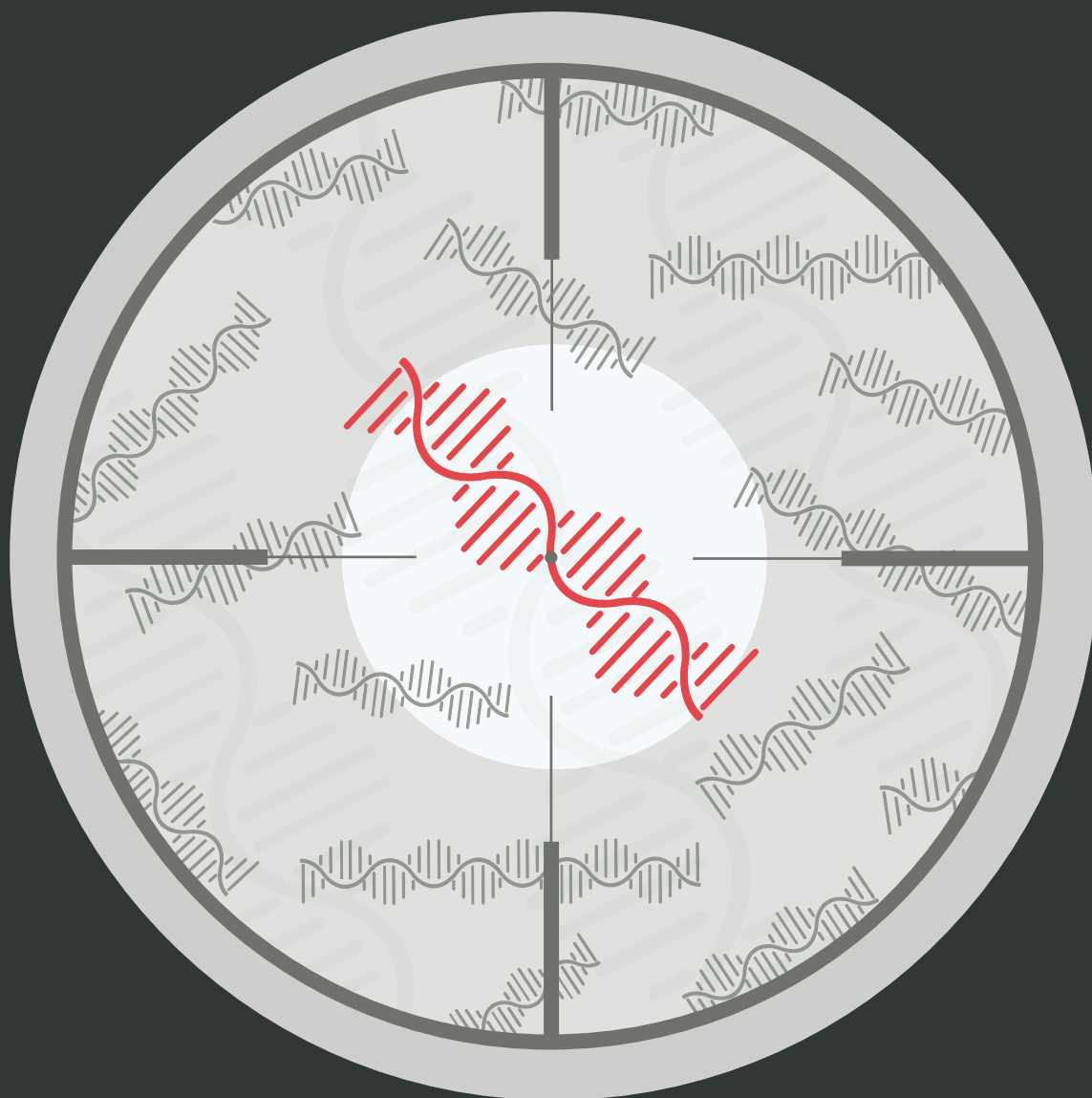


ВЕСТНИК РГМУ

03 / 2017 МАЙ-ИЮНЬ
VESTNIKRGMU.RU



РНК-ТЕРАПИЯ **ОБЗОР**

СТАТЬЯ РНК-терапия псориаза

37

Экспрессию «генов псориаза» нормализует
РНК-интерференция интерстициальной коллагеназы

МНЕНИЕ mitoCRISPR/Cas9

46

Можно ли создать технологию редактирования
митохондриальной ДНК?

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Денис Ребриков, д. б. н.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА Александр Эттингер, д. м. н.

РЕДАКТОРЫ Елена Куликова, Лилия Егорова

КОРРЕКТОР Ольга Комар

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова

РУКОВОДИТЕЛЬ РЕДАКЦИИ Елена Куликова

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

М. Р. Богомильский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор. (Москва, Россия)

В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

В. К. Боженко, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)

Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)

Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)

Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)

А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)

Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

А. А. Иванов, к. м. н. (Москва, Россия)

Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)

Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)

М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)

С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)

А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)

Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)

С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Х. П. Тахчиди, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

М. Л. Филипенко, к. б. н., в. н. с. (Новосибирск, Россия)

Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)

Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Л. Н. Шишкина, д. б. н., с. н. с. (Новосибирск, Россия)

Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

ДЛЯ ПОДАЧИ РУКОПИСЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

ДЛЯ СОТРУДНИЧЕСТВА manager@vestnikrgmu.ru

АДРЕС РЕДАКЦИИ ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включён в РИНЦ. IF 2014: 0,139

Журнал включён в Перечень 27.01.2016 (№ 1760)

Индекс Хирша (h²) журнала по оценке Google Scholar: 3

Здесь находится открытый архив журнала



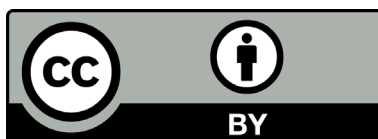
ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)



Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Учредитель и издатель — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International www.creativecommons.org



Подписано в печать 30.06.2017
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL
RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Alexander Oettinger, DSc

EDITORS Elena Kulikova, Liliya Egorova

PROOF-READER Olga Komar

TRANSLATORS Ekaterina Tretiyakova

EDITORIAL MANAGER Elena Kulikova

EDITORIAL BOARD

Bogomilskiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)

Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)

Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)

Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)

Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)

Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Ivanov AA, CSc (Moscow, Russia)

Kzyshkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)

Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)

Lebedev MA, PhD (Darem, USA)

Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)

Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)

Takhchidi KhP, corr. member of RAS, DSc (medicine), professor (Moscow, Russia)

Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)

Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)

Khazipov RN, DSc (Marsel, France)

Shimanovskii NL, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)

Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

FOR PAPERS SUBMISSION editor@vestnikrgmu.ru

FOR COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

ADDRESS ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997

The journal is included in RSCI. IF 2014: 0,139

The journal is included in the list of HAC 27.01.2016 (no. 1760)

Five-year h-index is 3

Free access archive of the journal is here



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)



The mass media registration certificate no. 012769 issued on July 29, 1994

Founder and publisher is Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License www.creativecommons.org



Approved for print 30.06.2017
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОБЗОР	5
Длинные некодирующие РНК — перспективная мишень для терапии различных заболеваний А. Ю. Филатова, П. А. Спарбер, И. А. Кривошеева, М. Ю. Скоблов Long noncoding RNAs are a promising therapeutic target in various diseases Filatova AYu, Sparber PA, Krivosheeva IA, Skoblov MYu	
МЕТОД	18
Нокдаун генов с использованием малых интерферирующих РНК Ю. В. Вяхирева, А. Ю. Филатова, И. А. Кривошеева, М. Ю. Скоблов siRNA-mediated gene silencing Vyakhireva JV, Filatova, AYu, Krivosheeva, IA, Skoblov MYu	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	32
Распределение таргетных малых интерферирующих РНК после внутривенного введения А. Ю. Кузеванова, А. С. Лунева, М. А. Маслов, А. В. Карпукхин, А. А. Алимов Distribution of intravenously injected small interfering RNAs in organs and tissues Kuzevanova AYu, Luneva AS, Maslov MA, Karpukhin AV, Alimov AA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	37
Оценка терапевтического потенциала РНК-интерференции интерстициальной коллагеназы для лечения псориаза Ю. А. Могилевцева, А. В. Мезенцев, С. А. Брускин RNA interference targeting interstitial collagenase is a potential therapeutic tool to treat psoriasis Mogulevtseva YuA, Mezentsev AV, Bruskin SA	
МНЕНИЕ	46
Перспективы генной терапии митохондриальных болезней: без CRISPR/Cas9 не обойтись? И. В. Чичерин, С. А. Левицкий, И. А. Крашенинников, И. Тарасов, П. А. Каменский The prospects of gene therapy for mitochondrial diseases: can't we do without CRISPR/Cas9? Chicherin IV, Levitsky SA, Krasheninnikov IA, Tarassov I, Kamenski P	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	52
Влияние выбора числа покрытий при секвенировании на точность определения единичных нуклеотидных вариантов Д. И. Борисевич, А. Ю. Красненко, И. Ф. Стеценко, Д. А. Плахина, В. В. Ильинский The impact of sequencing depth on accuracy of single nucleotide variant calls Borisevich DI, Krasnenko AYu, Stetsenko IF, Plakhina DA, Ilinsky VV	

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

57

Состояние локального иммунного статуса при различных вариантах преждевременных родов

Н. Ю. Каткова, О. И. Бодрикова, А. В. Сергеева, И. М. Безрукова, К. Б. Покусаева

The local immune profile of the woman and different scenarios of preterm delivery

Katkova NYu, Bodrikova OI, Sergeeva AV, Bezrukova IM, Pokusaeva KB

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

63

Применение реабилитационной системы BalanceTutor для восстановления функции равновесия и ходьбы у пациентов после острого нарушения мозгового кровообращения

Е. Ю. Сергеенко, С. А. Воловец, Л. Ю. Даринская, И. В. Житарева, А. И. Журавлева, А. В. Буторина, Ю. А. Яшнина, О. В. Волкова

The use of the BalanceTutor rehabilitation treadmill for balance and gait recovery in poststroke patients

Sergeenko EYu, Volovets SA, Darinskaya LYu, Zhitareva IV, Zhuravleva AI, Butorina AV, Yashinina YuA, Volkova OV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

71

Роль образовательного статуса матери в изменении генотип-средовых соотношений в структуре языковых характеристик

Д. Н. Чернов

The role of maternal education in regulating genetic and environmental contributions to the development of child's language competencies

Chernov DN

МНЕНИЕ

82

Использование методов генетической токсикологии для оценки повреждающего действия ионизирующих излучений электромагнитной природы на геномы

С. А. Рыжкин, А. Б. Маргулис, Б. М. Куриненко

Methods of genetic toxicology in the assessment of genomic damage induced by electromagnetic ionizing radiation

Ryzhkin SA, Margulis AB, Kurinenko BM

ДЛИННЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК — ПЕРСПЕКТИВНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А. Ю. Филатова¹ ✉, П. А. Спарбер¹, И. А. Кривошеева¹, М. Ю. Скоблов^{1,2,3}

¹ Лаборатория функциональной геномики, Медико-генетический научный центр, Москва

² Лаборатории медицинских генетических технологий, отдел фундаментальных исследований НИМСИ, Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова, Москва

³ Лаборатория функционального анализа генома, Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

На сегодняшний день в мире проводится около 2,5 тысяч клинических исследований препаратов для генной терапии. Несколько из них уже одобрены для клинического применения. Мишенями подавляющего большинства таких препаратов являются хорошо охарактеризованные белок-кодирующие гены. Однако в последние годы появляется всё больше исследований, посвященных длинным некодирующим РНК (днРНК) и их участию в различных клеточных процессах. Из 16 тысяч генов днРНК человека функционально охарактеризовано только около двух сотен. Но уже сейчас показана их возможная роль в развитии более 200 различных заболеваний, при этом в некоторых случаях они являются одним из ключевых звеньев патогенеза. Это делает длинные некодирующие РНК перспективной мишенью для генной терапии. Существующий арсенал молекулярно-биологических методов уже успешно применяют для разработки днРНК-направленных подходов к лечению различных заболеваний. В обзоре рассказывается об основных подходах к генной терапии с использованием днРНК.

Ключевые слова: длинные некодирующие РНК, малые интерферирующие РНК, антисмысловые олигонуклеотиды, генная терапия, опухолевые заболевания, наследственные заболевания

✉ **Для корреспонденции:** Филатова Александра Юрьевна
ул. Москворечье, д. 1, г. Москва, 115478; maacc@yandex.ru

Статья получена: 25.06.2017 **Статья принята к печати:** 28.06.2017

LONG NONCODING RNAs ARE A PROMISING THERAPEUTIC TARGET IN VARIOUS DISEASES

Filatova AYU¹ ✉, Sparber PA¹, Krivosheeva IA¹, Skoblov MYU^{1,2,3}

¹ Laboratory of Functional Genomics, Research Centre of Medical Genetics, Moscow, Russia

² Laboratory of Medical Genetic Technologies, Department of Basic Research of MDRI, Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

³ Genomic Functional Analysis Laboratory, Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russia

As of today, there have been about 2,500 gene therapy clinical trials initiated or completed worldwide. Some of the tested drugs have been already approved for clinical use. Most of these drugs target well-characterized protein-coding genes. At the same time, the past few years have witnessed an increasing interest in long noncoding RNAs (lncRNAs) and their role in cellular processes. Of 16,000 identified human lncRNA genes, biological functions have been elucidated for only two hundred. Nevertheless, we already know about their association with the development of 200 different disorders. In some cases these genes are the key element in disease pathogenesis, which makes long noncoding RNAs a promising target for gene therapy. To date, researchers successfully employ molecular biology techniques for the development of lncRNA-based therapeutic strategies. The following review focuses on the main approaches to gene therapy based on the use of lncRNA.

Keywords: long noncoding RNA, small interfering RNA, antisense oligonucleotides, gene therapy, cancer, inherited disease

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexandra Filatova
ul. Moskvorechie, d. 1, Moscow, Russia, 115478; maacc@yandex.ru

Received: 25.06.2017 **Accepted:** 28.06.2017

За последнее десятилетие было проведено множество исследований с применением методов секвенирования нового поколения (next generation sequencing), позволивших выявить удивительный феномен: примерно 70 % генома человека транскрибируется, но только 1,5 % транскриптов кодируют белки. Всё остальное приходится на некодирующие РНК (нкРНК). Они включают хорошо изученные классы рибонуклеиновых кислот: рибосомные (рРНК), транспортные (тРНК), микро-, малые ядерные (мяРНК) и малые ядрышковые РНК (мякРНК) и др. В последние годы

активно исследуется еще один класс нкРНК — длинные некодирующие РНК (днРНК). Ими называют транскрипты длиной более 200 нуклеотидов, которые не содержат протяженной открытой рамки считывания.

По последним данным проекта GENCODE (Encyclopedia of genes and gene variants), в геноме человека насчитывается 15 787 генов длинных некодирующих РНК [1]. При этом функциональная значимость описана менее чем для 200 из них [2]. Но уже ясно, что днРНК — это гетерогенная группа транскриптов, выполняющих разнообразные

функции в клетке. Они могут влиять на экспрессию генов на транскрипционном уровне за счет образования комплексов с транскрипционными факторами [3, 4] или привлечения хроматин-модифицирующих комплексов, таких как репрессивные комплексы PRC1 [5], PRC2 [4, 6, 7], LSD1 [8] или активирующий комплекс TrxG [9]. Кроме того, днРНК могут оказывать влияние и на посттранскрипционном уровне. Они способны активно взаимодействовать с микроРНК, тем самым регулируя уровень экспрессии их мишеней [10, 11]. Также днРНК могут образовывать дуплексы с мРНК-мишенью, ингибируя ее трансляцию [12] или изменяя стабильность [13, 14]. Более того, некоторые длинные некодирующие РНК способны оказывать влияние на сплайсинг пре-мРНК [15–17].

Несмотря на небольшое количество охарактеризованных днРНК, ясно, что они могут играть роль в развитии многих заболеваний. Так, в базе данных lncRNADisease содержатся записи примерно из 500 научных публикаций о 321 днРНК, участвующей в развитии 221 заболевания [18]: среди них опухолевые, нейродегенеративные, сердечно-сосудистые патологии, болезни геномного импринтинга и многие другие. При этом в некоторых случаях днРНК играют главную роль в молекулярном патогенезе заболевания, что делает их не только перспективными биомаркерами, но и мишенями для терапии. В обзоре мы приводим наиболее интересные примеры использования днРНК в качестве потенциальных мишеней для терапии различных заболеваний, а также описываем существующие на сегодняшний день подходы генной терапии, которые могут быть направлены на модуляцию активности днРНК.

Терапевтические подходы, направленные на изменение активности днРНК

Развитие и прогрессирование различных заболеваний могут быть связаны как с активацией экспрессии длинных некодирующих РНК [3, 19–23], так и со снижением их содержания в клетке [24–28]. Поэтому на сегодняшний день активно развиваются подходы к генной терапии, направленные на активацию и подавление экспрессии днРНК, а также на ингибирование их активности. К методам активации экспрессии генов можно отнести экспрессию с векторов, как плазмидных, так и вирусных, а также использо-

вание искусственных ген-специфичных транскрипционных активаторов. Для подавления экспрессии генов днРНК можно использовать такие подходы, как РНК-интерференция, антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), репрессия транскрипции и геномное редактирование. Ингибировать активность днРНК можно с помощью АСО или малых молекул.

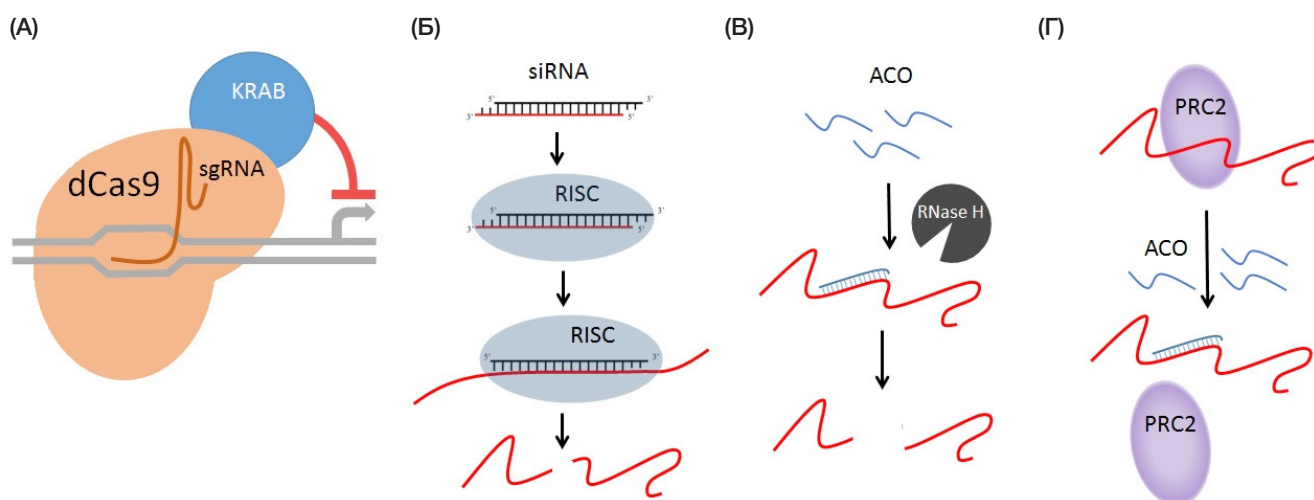
Указанные выше методы были разработаны для генной терапии заболеваний, вызываемых изменениями в белок-кодирующих генах, но хорошо подходят и для днРНК. При этом, арсенал методов воздействия на белок-кодирующие гены гораздо шире. Это связано с имеющимся на сегодняшний день большим объемом знаний о функционировании белков, тогда как о днРНК известно пока не так много. Большой потенциал для изучения имеют вторичные структуры, свойственные молекулам днРНК. Поэтому следует ожидать, что накопление знаний о функциях длинных некодирующих РНК в норме и при патологии приведет к разработке новых эффективных и высокоспецифичных методов генной терапии.

Ниже описаны принципы основных подходов, направленных на изменение экспрессии или активности длинных некодирующих РНК (рисунок).

Экспрессионные векторы

Использование экспрессионных векторов на сегодняшний день является самым распространенным методом увеличения экспрессии целевого гена как в научных исследованиях, так и в генной терапии. Существует большое количество различных векторов и способов их доставки в клетки (вирусных и невирусных) [29]. Данный подход активно используется для компенсации потери экспрессии функционального гена в результате возникновения в нем делеции или патогенной мутации.

Весьма перспективной является возможность использования ткане- или опухолеспецифических промоторов, что позволяет обеспечить специфичность экспрессии целевого гена. Например, известно, что промотор днРНК H19 активируется во многих опухолевых клетках. Таким образом, введение данного промотора в конструкцию, экспрессирующую гены-супрессоры опухолевого роста (как кодирующие, так и некодирующие), позволяет изменять их экспрессию только в тканях опухоли [30].



Некоторые генотерапевтические подходы, нацеленные на длинные некодирующие РНК (днРНК). (А) Репрессия транскрипции с использованием механизма CRISPRi. (Б) РНК-интерференция. (В) Антисмысловые олигонуклеотиды (АСО) активируют РНКазу H — зависимую деградацию РНК-мишени за счет образования РНК-ДНК-дуплекса. (Г) АСО препятствуют связыванию днРНК с репрессивным белковым комплексом PRC2

РНК-интерференция

РНК-интерференция — механизм подавления экспрессии генов при помощи малых молекул РНК. Такими молекулами являются малые интерферирующие РНК (siРНК) и микроРНК, представляющие собой РНК-дуплекс длиной 21–25 пар нуклеотидов. Одна из цепей малой РНК, называемая ведущей (guide strand), встраивается в комплекс RISC (RNA-induced silencing complex) и направляет его к своим РНК-мишеням. Это в итоге приводит к деградации целевой РНК или ингибированию ее трансляции.

Данный подход также является универсальным и пригоден для подавления экспрессии как белок-кодирующих генов, так и длинных некодирующих РНК. На сегодняшний день разрабатываются подходы к генной терапии с использованием siРНК и микроРНК или малых шпилечных РНК (shРНК) — предшественников siРНК, доставляемых в клетки в составе экспрессионного вектора. Несмотря на их высокую эффективность в подавлении экспрессии гена, использование механизма РНК-интерференции для терапии заболеваний часто сопряжено с проблемами доставки, специфичности и иммуногенности данных препаратов. Однако ведутся активные исследования, направленные на решение этих проблем, например с использованием химических модификаций малых РНК.

Антисмысловые олигонуклеотиды

Антисмысловые олигонуклеотиды (АСО) — это малые синтетические молекулы ДНК или РНК, способные по принципу комплементарности связываться с РНК-мишенями, подавляя их экспрессию или влияя на их функцию. Наиболее часто используемым механизмом действия АСО является привлечение РНКазы H, которая расщепляет молекулу целевой РНК в составе РНК–ДНК-гибрида [31]. Другим примером действия антисмысловых олигонуклеотидов является влияние на прохождение сплайсинга, при котором связывание АСО с участком пре-мРНК ведет к блокированию связывания с ней определенных факторов сплайсинга (splice-switching) [32]. В этом случае антисмысловые олигонуклеотиды синтезируют со специальными химическими модификациями, такими как пептидо-нуклеиновые кислоты (peptide nucleic acid, PNA) или морфолиновые олигонуклеотиды (phosphoramidate morpholino oligomer, PMO), в результате чего они не приводят к активации РНКазы H-зависимого расщепления [33]. Для длинных некодирующих РНК также показан механизм блокирования их связывания с хроматин-модифицирующим комплексом PRC2 за счет связывания с АСО [21].

Кроме PNA- и PMO-модификаций олигонуклеотидов существуют и другие. Самыми распространенными из них являются LNA (Locked nucleic acid) и 2'-O-Methyl (2'-OMe)-модификации. Они повышают стабильность олигонуклеотида, а также его специфичность и аффинность связывания с РНК-мишенью. Кроме того, было показано, что LNA-модификация не влияет на способность молекул РНК встраиваться в комплекс RISC [33]. Таким образом, на сегодняшний день РНК-интерференция и использование антисмысловых олигонуклеотидов являются наиболее часто используемыми методами подавления экспрессии генов в клинической практике. По данным на 2016 г., 26 лекарственных препаратов на основе siРНК и АСО проходят различные стадии клинических испытаний для более чем 50 заболеваний [33].

Редактирование генома

Перспективными выглядят подходы геномного редактирования, позволяющие как исправить патогенную мутацию, так и провести нокаут гена. В случае длинных некодирующих РНК последний вариант кажется наиболее реализуемым (ниже будут приведены примеры заболеваний, возникающих при чрезмерной экспрессии днРНК).

Редактирование генома стало широкодоступным после исследования механизмов связывания с ДНК искусственно созданных белков типа «цинковые пальцы» (ZNF) [34] и затем белков-эффекторов, подобных активаторам транскрипции (TALENs) [35]. Эти подходы основаны на возможности определенных белковых последовательностей (мономеров) связываться с конкретными нуклеотидами в составе двуцепочечной ДНК. Чередование таких мономеров позволяет создать белок, связывающийся с заданной (желаемой) последовательностью ДНК. При этом каждый мономер ZNF узнает последовательность из трех нуклеотидов, тогда как мономер TALEN распознает отдельные нуклеотиды, что делает последний метод гораздо более универсальным.

Однако немного позже начала активно использоваться еще одна система редактирования генома — CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats). В отличие от предыдущих систем узнавание целевой последовательности ДНК системой CRISPR осуществляется за счет комплементарного связывания направляющей РНК (small guide RNA, sgРНК) с ДНК и привлечения нуклеазы Cas9, способной расщеплять двуцепочечную ДНК. Система CRISPR/Cas9 является значительно более эффективной и простой в применении, чем ZNF или TALEN [36]. Поэтому на сегодняшний день она является самым распространенным методом редактирования генома и решения других задач [37]. И хотя до сих пор ведутся споры относительно допустимости ее использования в клинической практике из-за недостаточной специфичности [38–40], многие группы ученых ведут исследования по оптимизации и разработке подходов к генной терапии на основе системы CRISPR/Cas9.

Регуляция транскрипции

Кроме как для редактирования генома, технология CRISPR/Cas9 может быть использована для изменения экспрессии генов без вмешательства в структуру ДНК. Для этого в последовательность нуклеазы Cas9 были внесены мутации, инактивирующие ее нуклеазную активность, а получившийся белок назвали dCas9 (deactivated Cas9). К нему можно присоединять различные белковые домены, активирующие (CRISPRa: VP64, p65, Rta) или репрессирующие (CRISPRi: KRAB, ZNF10) транскрипцию, и таким образом влиять на экспрессию генов [41–44]. Использование данных систем показало свою эффективность на клеточных культурах. Например, Gilbert и соавт. применили систему dCas9-KRAB для репрессии транскрипции 5 днРНК, вовлеченных в канцерогенез (H19, MALAT1, NEAT1, TERC, XIST). При этом экспрессия РНК-мишеней снижалась более чем на 80 %, что не уступает по эффективности РНК-интерференции или использованию АСО [45]. В то же время Perez-Pinera и соавт. показали возможность усиления транскрипции различных белок-кодирующих генов в 2–250 раз с применением системы dCas9-VP64 [44].

Использование подходов CRISPRa/i имеет ряд преимуществ перед РНК-интерференцией и экспрессионными

векторами. Во-первых, только система CRISPRa/i позволяет модулировать функцию РНК *in cis*. Известно, что часто некодирующие РНК проявляют свою функцию в локусе транскрипции, а иногда именно сам процесс транскрипции днРНК важен для регуляции экспрессии соседних генов [21, 28, 46]. Во-вторых, активация эндогенного промотора будет приводить к экспрессии всех альтернативных изоформ РНК в их необходимых соотношениях [47]. Впрочем, существует и ряд ограничений применения систем на основе CRISPR для регуляции работы длинных некодирующих РНК, так как они часто перекрываются с одним или несколькими белок-кодирующими генами или имеют с ними общую промоторную область. Поэтому изменение транскрипции таких днРНК может привести к нежелательному влиянию на экспрессию соседних генов [47].

Влияние на активность днРНК при помощи малых молекул

Другим подходом к терапии заболеваний, развитие которых связано с днРНК, является использование малых молекул, препятствующих взаимодействию днРНК с их белковыми партнерами [48, 49]. С помощью высокопроизводительного скрининга можно выявлять малые молекулы, препятствующие образованию комплекса днРНК–белок и в дальнейшем использовать эти молекулы для лечения заболеваний [50]. По сравнению с другими генно-терапевтическими агентами малые молекулы лучше доставляются и поглощаются клетками. Известные взаимодействия между днРНК и белком, такие как HOTAIR–PRC2, ANRIL–CBX7, PCAT-1–PRC2 и H19–EZ2 стали привлекательными мишенями для скрининга ингибиторов малых молекул [51]. Например, в работе Zhou и соавт. две малые молекулы, DZNER и 2-PCPA, были использованы для ингибирования взаимодействия днРНК HOTAIR с белками PRC2 и LSD1 для изучения роли HOTAIR в развитии глиобластомы [52].

Примеры днРНК — потенциальных мишеней для терапии различных заболеваний

днРНК SAMMSON в развитии меланомы

Меланома — злокачественная опухоль, образующаяся из пигментных клеток кожи, меланоцитов. Для меланомы характерен повышенный риск образования метастазов [53]. По статистике, приведенной Американским онкологическим обществом (American cancer society), на меланому приходится около 4–6 % всех вновь выявляемых случаев рака [54].

В 2016 г. в работе Leucci и соавт. [3] были проведены обширные исследования роли длинной некодирующей РНК SAMMSON в развитии меланомы и возможности использования этой днРНК в качестве мишени для терапии. Основываясь на данных проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA), авторы продемонстрировали, что данная днРНК имеет эктопическую экспрессию более чем в 90 % образцов меланомы. Более того, экспрессия данной РНК является меланомоспецифической. В дальнейшей экспериментальной работе было показано, что экспрессия SAMMSON активируется при воздействии известного меланомоспецифического транскрипционного фактора SOX10. При этом нокдаун SAMMSON с использованием LNA-модифицированных олигонуклеотидов в меланомных клеточных культурах привел к значительному снижению скорости роста клеток и усилению апоптоза. Также

исследователи показали, что SAMMSON напрямую взаимодействует с белком p32, а нокдаун SAMMSON приводит к снижению митохондриальной фракции p32. Это, в свою очередь, приводит к нарушению синтеза белков дыхательной цепи митохондрий, снижению потенциала мембраны митохондрий и апоптозу. Кроме того, снижение количества p32 в митохондриях приводит к накоплению «токсичных» предшественников митохондрий, что также индуцирует гибель клеток.

Таким образом, SAMMSON является хорошей таргетной мишенью для терапии меланомы. Для демонстрации этого Leucci и соавт. провели исследование *in vivo*. Мышам прививали ксенографтные опухоли меланомы. После чего внутривенно вводили модифицированный антисмысловый олигонуклеотид против днРНК SAMMSON. Использование целевого олигонуклеотида приводило к значимому снижению темпов роста опухоли по сравнению с контролем: примерно в 1,5 раза. Кроме того, использование данного олигонуклеотида в комбинации с дабрафенибом (селективным ингибитором киназы BRAF с мутацией V600E) приводило к значительному — более чем в 2 раза — усилению терапевтического эффекта последнего. Таким образом, исследователи пришли к выводу, что днРНК SAMMSON может быть использована как информативный биомаркер меланомы, а также как перспективная мишень для терапии данного заболевания.

днРНК BCAR4 в развитии рака молочной железы

Опухоль молочной железы — самое распространенное опухолевое заболевание среди женщин. При этом в структуре смертности от опухолевых заболеваний у женщин рак молочной железы стоит на втором месте (14 %). В работе Xing и соавт. [19] было продемонстрировано, что экспрессия днРНК BCAR4 не детектируется в нормальных тканях молочной железы, но присутствует более чем в половине образцов опухолей молочной железы. При этом уровень экспрессии BCAR4 возрастает на стадии метастазирования в лимфатические узлы, а ее повышенная экспрессия коррелирует со снижением кумулятивной выживаемости пациентов. Кроме того, предыдущие исследования других авторов показали, что экспрессия BCAR4 активируется в клетках опухоли в ответ на лечение тамоксифеном, что делает клетки нечувствительными к дальнейшей терапии антиэстрогеновыми препаратами [55].

Xing и соавт. [19] показали также, что нокдаун гена BCAR4 в клеточных линиях опухоли молочной железы приводит к значительному снижению уровня миграции и инвазии клеток, но не к снижению их пролиферации. Используя методики аффинной очистки лизатов и масс-спектрометрии, исследователям удалось установить, что днРНК BCAR4 напрямую взаимодействует с белками SNIP1 и PNUITS. При этом было выявлено, что BCAR4 через SNIP1 образует комплекс с фосфорилированным белком GLI2. GLI2 является транскрипционным фактором, регулирующим транскрипцию генов клеточной миграции и инвазии через активацию сигнального пути Hedgehog. С помощью ChiRP-анализа (Chromatin isolation by RNA purification) была выявлена локализация транскрипта BCAR4 в области промотора гена-мишени GLI2, при этом нокдаун гена BCAR4 приводил к снижению экспрессии транскрипционного фактора.

Также было установлено, что данная днРНК при взаимодействии с белком PNUITS образует комплекс с фосфатазой PP1, которая, в свою очередь, дефосфорилирует

РНК-полимеразу II, что необходимо для ее нормального функционирования. Таким образом, было показано, что днРНК BCAR4 является важным участником комплекса, активирующего транскрипцию генов-мишеней GLI2, что на клеточном уровне приводит к активизации миграции и инвазии клеток опухоли.

В конце своей работы Xing и соавт. продемонстрировали терапевтический эффект нокдауна BCAR4 *in vivo*. У мышей моделировали активно метастазирующую опухоль с использованием ксенографта. Далее мышам внутривенно вводили по отдельности 2 различных модифицированных антисмысловых олигонуклеотида (LNA) против BCAR4 и сравнивали с контрольной неспецифической (scramble) LNA. У мышей, обработанных таргетными LNA, значительно снижалось легочное метастазирование относительно контроля. При этом размер первичной опухоли не изменялся.

Кроме того, исследователи использовали другой подход для лечения мышей: инъекции таргетных shRNA в жировую ткань непосредственно молочной железы. При таком воздействии также наблюдалось значительное снижение уровня метастазирования в легкие при том же размере первичной опухоли. Однако в последнем случае эффект был более выраженным, чем при внутривенном введении LNA. Xing и соавт. предлагают использовать экспрессию BCAR4 как важный прогностический признак прогрессии опухоли молочной железы и как мишень для ингибирования метастазирования опухоли у пациентов с высоким риском метастазирования и у пациентов с развившейся резистентностью к антиэстрогеновым препаратам.

днРНК HOTAIR в развитии различных опухолевых заболеваний

HOTAIR (Hox transcript antisense intergenic RNA) — одна из первых некодирующих РНК, для которой было показано участие в развитии опухолевых заболеваний [7]. HOTAIR транскрибируется с антисмысловой цепи кластера генов HOXC на хромосоме 12 и способна привлекать к другому кластеру гомеобоксных генов, HOXD, репрессирующие комплексы белков PRC2 (polycomb repressive complex 2) [7] и LSD1 (lysine-specific demethylase 1) [8]. При этом активность комплекса PRC2 приводит к метилированию гистона H3K27, а активность комплекса LSD1 — к деметилированию H3K4me2, что приводит к подавлению транскрипции генов-мишеней. В последующих работах было показано, что HOTAIR способна привлекать PRC2-комплекс не только к генам HOXD, но и множеству других генов. В том числе к гену рецептора прогестерона *PGR*, к генам семейства протокадгеринов (*PCDH10*, *PCDH5*, *PCDH20*), генам, вовлеченным в опухолевый ангиогенез — *EPHA1* и *JAM2* [56], а также генам-супрессорам опухолевого роста (*PTEN* [7]).

Было показано, что экспрессия HOTAIR в метастазах опухоли молочной железы увеличена в сотни раз [56], тогда как уровень ее экспрессии в первичной опухоли достаточно гетерогенен. Анализ первичных опухолей показал, что высокий уровень экспрессии HOTAIR является значимым прогностическим признаком развития метастазов и снижения выживаемости пациентов. Кроме того, в экспериментах на клеточных культурах и *in vivo* на мышах было показано, что увеличение экспрессии HOTAIR ведет к увеличению инвазивной активности клеток опухоли и развитию метастазов в легких. Например, Gupta и соавт. подсаживали мышам опухолевую клеточную линию MDA-MB-231, содержащую вектор, сверхэкспрессирующий HOTAIR, или контрольный пустой вектор. Первичный размер опухоли у

мышей с сверхэкспрессией HOTAIR был значимо, но несильно увеличен по сравнению с контролем, тогда как уровень метастазирования в легкие при увеличении экспрессии HOTAIR возрос в 4 раза [56].

В дальнейшем была показана роль HOTAIR в развитии целого ряда опухолевых заболеваний, таких как сквамозно-клеточный рак пищевода, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, гепатоцеллюлярная карцинома, рак эндометрия, рак простаты, назофарингеальная карцинома, сквамозно-клеточный рак гортани, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, меланома, глиома, саркома. Причем в большинстве случаев повышенная экспрессия HOTAIR коррелирует с активностью метастазирования и ухудшением прогноза течения заболевания [57].

В связи с этим HOTAIR может являться мишенью для эффективной терапии некоторых опухолевых заболеваний, особенно с неблагоприятным прогнозом. Действительно, на сегодняшний день, существует ряд работ, сообщающих об экспериментах *in vivo* на ксенографтных мышинных моделях, в которых снижение экспрессии HOTAIR приводило к значительному торможению роста опухоли. Например, в работе Li и соавт. были проведены эксперименты с мышшиной моделью сквамозно-клеточного рака гортани. Животным подкожно вводили клетки Her-2, после чего у них развивались опухоли. В дальнейшем проводили внутриопухолевые инъекции лентивирусного вектора, содержащего shRNA против HOTAIR. В результате размер опухоли после введения целевой shRNA был значительно ниже по сравнению с контрольной группой (1,113 ± 0,209 г против 1,960 ± 0,584 г соответственно) [58].

днРНК MALAT1 в развитии различных опухолевых заболеваний

Длинная некодирующая РНК MALAT1 (Metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1) была впервые описана еще в 1997 г., однако свое нынешнее название получила только в 2003 г. Тогда Ji и соавт. показали, что ее экспрессия ассоциирована с развитием метастазов у пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Это была первая днРНК, для которой была описана ее роль в развитии опухолевых заболеваний [59]. При этом MALAT1 экспрессируется на высоком уровне во многих нормальных тканях человека и является консервативной среди млекопитающих [59]. В дальнейшем было показано, что MALAT1 локализуется в основном в ядре клетки в составе nuclear speckles [15].

Оказалось, что MALAT1 способна образовывать комплексы с SR-белками сплайсинга и изменять их локализацию в ядре, а также модулировать фосфорилирование белков SF2/ASF. Более того, Tripathi и соавт. продемонстрировали, что нокдаун MALAT1 в клеточной линии аденокарциномы шейки матки Hela приводит к изменению альтернативного сплайсинга многих генов [16]. Хотя в других исследованиях, проведенных на клеточных линиях опухолей легкого (A549, WT, GFP, KO1-3), не было показано значимое влияние нокдауна MALAT1 на альтернативный сплайсинг [60]. Кроме того, мыши, нокаутные по MALAT1, нормально развиваются и не демонстрируют никакого патологического фенотипа или даже изменения в локализации SR-белков. Такое несоответствие полученных результатов может быть связано с тем, что MALAT1 может выполнять различные функции у мыши и человека, или с тем, что для проявления фенотипического влияния MALAT1 необходимы какие-либо специальные, возможно, стрессовые, условия [20, 61].

Тогда как вопрос о влиянии MALAT1 на альтернативный сплайсинг остается дискуссионным, участие этой днРНК в регуляции экспрессии генов-мишеней не вызывает сомнений. В работе Тапо и соавт. было продемонстрировано, что нокдаун MALAT1 в клеточной линии легочной карциномы A549 значительно снижает экспрессию генов (*CTHRC1*, *CCT4*, *HMMR*, *ROD1* и др.), отвечающих за клеточную миграцию, что приводит к снижению уровня подвижности клеток [62]. Расширенное исследование других авторов, проведенное на нескольких клеточных линиях, также продемонстрировало роль MALAT1 в активации экспрессии генов, приводящих к метастазированию опухолей (*GPC6*, *LPHN2*, *CDCP1* и *ABCA1*). При этом уровень экспрессии генов-ингибиторов миграции и инвазии клеток (*MIA2*, *ROBO1*) при нокдауне MALAT1 увеличивался [60]. Возможный механизм влияния MALAT1 на экспрессию генов был описан в работе Yang и соавт. где было показано, что MALAT1 способна образовывать комплекс с белком Pc2, причем только с неметилированной его фракцией, тогда как метилированная фракция Pc2 взаимодействует с другой днРНК, TUG1, и входит в состав комплекса PRC1 (polycomb repressive complex 1) [5].

Уже в самых первых работах была показана роль MALAT1 в развитии метастазов опухолей легкого человека [59, 62]. В дальнейшем была продемонстрирована роль aberrантной экспрессии MALAT1 во многих видах опухолей, включая рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, нейробластому, остеосаркому, рак яичников, рак простаты, аденому гипофиза, миеломную болезнь и рак почки [20].

Все вышеперечисленное делает MALAT1 перспективной мишенью для терапии различных опухолей с целью предотвращения их метастазирования. В работе Gutschner и соавт. была исследована модель метастазирования клеток опухоли легкого человека у мыши *in vivo*. Для этого мышам прививали подкожно первичную опухоль, состоящую из клеток человека EBC-1. После чего делили животных на 2 группы: одной группе подкожно вводили антисмысловый олигонуклеотид против MALAT1, а второй — контрольный АСО. В результате было показано, что размер первичной опухоли не отличался в двух группах, тогда как количество и размер метастазов в легкие были меньше в группе мышей с введенным АСО к MALAT1. Исходя из результатов эксперимента, авторы делают вывод, что нокдаун MALAT1 в опухоли может быть эффективным для предотвращения метастазирования опухоли [60].

днРНК BACE1-AS в развитии болезни Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера — наиболее частая форма возрастной деменции; нейродегенеративное заболевание, проявляющееся в виде нарушений памяти, речи и когнитивных способностей. В основе заболевания лежит гибель нейронов в результате внеклеточного накопления β -амилоидных бляшек, повреждающих клетки [63]. Ведущую роль в формировании амилоидных бляшек играет белок BACE1 (β -site APP-cleaving enzyme 1). Данный белок является β -секретазой и расщепляет белок-предшественник APP до β -амилоида, образующего бляшки [64].

BACE1-AS — некодирующая РНК длиной около 2 тыс. оснований, транскрибируемая с противоположной цепи локуса BACE1 (11q23.3). Данная днРНК содержит участок длиной 106 нуклеотидов, полностью комплементарный эк-

зону 6 мРНК BACE1. Faghghi и соавт. исследовали участие BACE1-AS в патогенезе болезни Альцгеймера, наблюдая за экспрессией BACE1 [13]. Специфический нокдаун BACE1-AS в клеточной линии нейроblastомы человека (SH-SY-5Y) приводил к значительному снижению уровня не только самой BACE1-AS, но и ее антисмыслового партнера BACE1, а также белка β -секретазы. С другой стороны, увеличение экспрессии BACE1-AS сопровождалось увеличением уровня BACE1 как на уровне РНК, так и на уровне белка. Кроме того, исследователи показали, что BACE1 и BACE1-AS формируют РНК-РНК-дуплекс, образование которого приводит к увеличению стабильности мРНК BACE1. При этом различные стрессовые воздействия на клетки, в том числе и их обработка амилоидными бляшками, приводят к совместному повышению уровня экспрессии BACE1 и BACE1-AS.

Полученные данные также подтверждает тот факт, что у пациентов с болезнью Альцгеймера уровень экспрессии BACE1-AS в пораженных областях мозга в 2–6 раз выше, чем в контрольных образцах. Таким образом, при болезни Альцгеймера различные клеточные стрессы приводят к повышению экспрессии днРНК BACE1-AS, которая образует дуплекс с мРНК BACE1, тем самым повышая ее стабильность. В результате растет содержание β -секретазы и происходит накопление амилоидных бляшек, что, в свою очередь, еще больше повышает уровень экспрессии BACE1-AS, замыкая порочный круг.

Основываясь на предыдущем исследовании, авторы выдвинули гипотезу о возможности использования siRNA против BACE1-AS и BACE1 для терапии болезни Альцгеймера *in vivo* [65]. Для этого использовали трансгенных мышей Tg-19959, в клетках которых синтезировался человеческий мутантный белок APP. Животным была имплантирована осмотическая миниомпа в третий желудочек головного мозга и затем в течение 14 дней им вводили LNA-модифицированные siРНК против BACE1 и BACE1-AS отдельно и совместно. В результате все три варианта нокдауна привели к значительному снижению уровня BACE1, а самым эффективным подходом оказался нокдаун обоих транскриптов одновременно: уровень BACE1 снижался до 60 % от исходного уровня. Далее авторы исследовали влияние нокдауна BACE1-AS на уровень нерастворимого бета-амилоида *in vivo*. После 14-дневной инфузии siRNA против BACE1-AS в тканях гиппокампа был измерен уровень β -амилоида. Было показано, что использование siRNA против BACE1-AS приводит к значительному снижению содержания нерастворимого β -амилоида в тканях гиппокампа исследуемых мышей, тогда как уровень растворимого амилоида не изменялся. Faghghi и соавт. подчеркивают, что BACE1 и BACE1-AS могут быть полезны в качестве мишеней для терапии болезни Альцгеймера.

днРНК SMN-AS1 в развитии спинальной мышечной атрофии

Спинальная мышечная атрофия (СМА) — это аутоcомно-рецессивное наследственное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью нейронов передних рогов спинного мозга и проявляющееся симметричной мышечной слабостью и атрофией [66]. Причиной СМА является делеция или мутация в гене *SMN1* (Survival Motor Neuron 1) [67]. Известно, что у человека в результате дупликации гена *SMN1* образовался ген *SMN2*. Последовательность последнего практически идентична исходной последовательности, но содержит однонуклеотидную

замену в экзоне 7, из-за чего происходит нарушение сплайсинга пре-мРНК SMN2, а ее экзон 7 не включается в зрелую мРНК. Следствием этого является образование укороченного нестабильного белка, хотя при этом около 10–20 % пре-мРНК SMN2 сплайсируются правильно и в результате образуется зрелый белок, идентичный продукту гена SMN1 [68, 69].

У человека ген SMN2 расположен в нестабильной хромосомной области, которая часто подвергается процессам дуплицирования, делетирования и генной конверсии. Из-за этого количество копий гена SMN2 у людей может варьировать [70]. При этом больные СМА с большим числом копий SMN2 имеют более мягкую форму заболевания [71]. Для СМА I типа с 1–2 копиями гена SMN2 характерен наиболее ранний дебют и смерть в возрасте до 2 лет. При СМА III и IV типов в геноме присутствуют 3 или более копии гена SMN2, при этом болезнь характеризуется юношеским или взрослым дебютом и менее быстрым прогрессированием [72].

Таким образом, методы, направленные на повышение эндогенного содержания SMN2, могут привести к значительному улучшению состояния больных с СМА. Такой подход к терапии СМА был описан в работе Woo и соавт. [21]. Исследователи проанализировали общедоступные данные ChIP-seq (иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием) из проекта ENCODE и сделали вывод о том, что репрессивный комплекс PRC2 связывается с геномным локусом SMN2. Далее авторы проводили эксперименты на первичных клеточных культурах фибробластов больных СМА. Было показано, что нокадаун белков EZH1 и EZH2, входящих в состав комплекса PRC2, приводит к более чем двукратному увеличению содержания полноразмерной мРНК SMN с экзонам 7.

Woo и соавт. также обнаружили ранее неисследованную днРНК, транскрибируемую с локуса SMN, которую они назвали SMN-AS1 (SMN-Antisense 1). Из-за высокой степени гомологии между локусами генов SMN1 и SMN2 авторы предположили, что SMN-AS1 транскрибируется с обоих локусов. И действительно, методом ОТ-ПЦП была установлена зависимость между уровнем экспрессии SMN-AS1 и количеством копий гена SMN2 в геноме. Кроме того, авторы показали, что SMN-AS1 способна привлекать в геномные локусы SMN комплекс PRC2, подавляющий транскрипцию генов, т. е. SMN-AS1 негативно регулирует уровень SMN-транскриптов.

Вышесказанное означает, что снижение активности SMN-AS1 можно использовать в качестве подхода для терапии СМА. В рассматриваемой работе авторы предложили метод, основанный не на модуляции уровня днРНК в клетке, а на блокировании ее взаимодействия с PRC2-комплексом. Этого достигали путем добавления LNA-модифицированных АСО, комплементарных участку связывания SMN-AS1 с PRC2. Введение таких LNA в первичные фибробласты больных СМА привело к увеличению содержания полноразмерного продукта гена SMN в 6 раз. А РНК-иммунопреципитация (RIP) подтвердила нарушение взаимодействия SMN-AS1 с белками PRC2-комплекса. При этом эффект применения LNA был специфичным и мало влиял на взаимодействие других днРНК с PRC2. К тому же было показано, что повышение содержания полноразмерного SMN зависело от концентрации LNA. Схожие результаты авторами были получены и на модели нейрональных клеток больных СМА.

Кроме того, Woo и соавт. исследовали эффект использования LNA против SMN-AS1 совместно с другими ранее

описанными АСО, корректирующими сплайсинг гена SMN2 [73]. В результате было установлено, что обработка клеток двумя антисмысловыми олигонуклеотидами приводит к двукратному увеличению содержания полноразмерной мРНК SMN2 по сравнению с использованием только корректора сплайсинга. Содержание функционального белка SMN при этом также увеличивалось. Таким образом, совмещая два подхода, можно получить максимальный терапевтический эффект.

днРНК HTTAS в развитии болезни Гентингтона

Болезнь Гентингтона — аутосомно-доминантное прогрессирующее нейродегенеративное заболевание с поздним началом, проявляющееся экстрапирамидными симптомами и когнитивными нарушениями [74]. Причиной данного заболевания является экспансия тринуклеотидного повтора CAG в гене гентингтина (HTT). В норме количество повторов варьирует от 9 до 36, увеличение числа повторов свыше 37 приводит к трансляции белка, содержащего длинный полиглутаминовый тракт. Такой белок является токсичным для клеток [75].

В работе Chung и соавт. была обнаружена новая днРНК HTTAS (huntingtin antisense), транскрибирующаяся с антисмысловой цепи геномного локуса HTT [28]. Было описано две изоформы HTTAS, из которых наибольший интерес представляет одна — HTTAS_v1, т. к. ее первый экзон включает область экспансии CAG-повторов. В работе было продемонстрировано, что уровень экспрессии антисмыслового транскрипта зависит от длины CAG-повтора: чем больше число повторов, тем ниже уровень экспрессии. Эксперименты по нокадауну и увеличению уровня экспрессии HTTAS_v1 в клеточных линиях человека HEK293 и SH-SY-5Y показали, что данный транскрипт негативно регулирует уровень мРНК гена HTT. Например, увеличение экспрессии HTTAS_v1 при помощи генетической конструкции, содержащей промотор цитомегаловируса, приводит к снижению содержания HTT на 90 % вне зависимости от длины повтора, тогда как при нативном уровне экспрессии HTTAS_v1 ее негативное влияние на HTT снижается при увеличении длины повтора. Таким образом, если в норме HTTAS сдерживает уровень экспрессии HTT, то при патологии этот механизм нарушается, что приводит к избыточному накоплению токсичного белка в клетках и возможному усугублению течения заболевания. В заключение авторы указывают, что повышение уровня HTTAS_v1 можно в перспективе использовать в терапии болезни Гентингтона.

днРНК UBE3A-ATS в развитии синдрома Ангельмана

Синдром Ангельмана — заболевание, связанное с нарушением геномного импринтинга, характеризующееся умственной отсталостью, отсутствием речи, припадками и специфическим поведением [76]. Причиной развития данного синдрома в 60–70 % случаев является делеция участка 15q11-13 на материнской хромосоме. Другими, менее распространенными, причинами являются отцовская однопородительская дисомия (2–5 % случаев) и мутации в гене UBE3A (20 % случаев). Все эти механизмы приводят к отсутствию экспрессии гена UBE3A, кодирующего E3 убиквитин лигазу, которая в нейронах в норме экспрессируется только с материнской хромосомы.

UBE3A-ATS — длинная некодирующая РНК, транскрибирующаяся с антисмысловой цепи гена UBE3A. Было

показано, что у человека и мыши она является частью большого транскрипта, точка инициации транскрипции которого находится перед центром импринтинга на длинном плече хромосомы 15 [77]. В норме эта днРНК в нейронах экспрессируется только с отцовской хромосомы, тогда как транскрипция смыслового гена *UBE3A* с нее не происходит [78].

В работе Meng и соавт. был исследован механизм регуляции экспрессии мРНК *UBE3A* ее антисмысловым партнером днРНК *UBE3A-ATS* [46]. Используя мышиную модель синдрома Ангельмана, авторы показали, что делеция промотора *UBE3A-ATS* приводит к активации экспрессии *UBE3A* с отцовской хромосомы *in vivo*. Для подтверждения того, что процесс транскрипции *UBE3A-ATS* приводит к подавлению экспрессии *UBE3A*, были получены мыши, в геноме которых содержались сигналы преждевременной терминации транскрипции для *UBE3A-ATS* на отцовской хромосоме. Было обнаружено, что в нервных клетках, в которых не происходит транскрипции *UBE3A-ATS* с отцовской хромосомы, уровень экспрессии *UBE3A* увеличился. Так была показана роль некодирующей РНК *UBE3A-ATS* в подавлении экспрессии *UBE3A* на отцовской хромосоме. Следовательно, в случае делеции этого участка материнской хромосомы активация экспрессии *UBE3A* с отцовской хромосомы не приводит к развитию патологического фенотипа.

В 2015 г. той же группой исследователей была опубликована еще одна работа, в которой было предложено использовать подавление экспрессии *UBE3A-ATS* с помощью АСО для активации экспрессии *UBE3A* с отцовской хромосомы с целью терапии синдрома Ангельмана. Работу проводили на мышиную модель заболевания. Авторы получили культуру нейронов модельных животных и обработали ее АСО против *UBE3A-ATS*, что привело к повышению уровня экспрессии *UBE3A* до 66–90 % от уровня экспрессии этого гена в нейронах мышей дикого типа. Кроме того, авторы подтвердили специфичность использования АСО. Проведенная ими ПЦР с обратной транскрипцией показала, что уровень экспрессии соседних с *UBE3A* генов не изменился.

Также был проведен ряд экспериментов *in vivo*, в которых АСО против *UBE3A-ATS* однократно вводили в латеральный желудочек головного мозга взрослым модельным мышам. Животные хорошо перенесли инъекции. Через месяц у мышей не наблюдали существенных изменений в массе тела, гибели нервных клеток или повышенного образования глиальной ткани. При этом через 4 нед. после введения АСО наблюдали значительное снижение уровня *UBE3A-ATS* — на 60–70 %, а уровень экспрессии *UBE3A* при этом увеличивался в 2–5 раз в различных областях головного и спинного мозга. После однократной инъекции АСО сниженный уровень экспрессии *UBE3A-ATS* наблюдали в течение 16 нед., после чего он восстанавливался до исходного значения к 20 нед. Аналогичные данные были получены и для *UBE3A*. Кроме того, анализ фенотипа показал, что введение АСО модельным мышам приводило к смягчению когнитивных и других фенотипических нарушений, ассоциированных с заболеванием [22].

днРНК DBE-T в развитии лице-лопаточно-плечевой миодистрофии Ландузи–Дежерина 1 типа

Лице-лопаточно-плечевая миодистрофия Ландузи–Дежерина 1 типа (МЛД1) — аутосомно-доминантная мышечная дистрофия, для которой характерна прогрессирующая

потеря мышечной силы в мышцах лица и пояса верхних конечностей [79]. Причиной заболевания является делеция в хромосомном регионе 4q35, в котором у здоровых людей находится от 11 до 110 копий макросателлитного повтора D4Z4 длиной 3,3 тыс. пар нуклеотидов. При снижении количества повторов меньше 11 развивается заболевание [23]. При наличии большого числа копий повторов D4Z4 данный геномный локус находится в состоянии гетерохроматина и в нем не происходит транскрипция. В поддержании статуса гетерохроматина локуса 4q35 играет роль репрессивный комплекс PRC2, обладающий метилтрансферазной активностью в отношении гистона H3 (H3K27me3). У пациентов с МЛД1 при снижении количества повторов происходит снижение уровня метилирования H3K27me3 и дерепрессия транскрипции генов из 4q35-области, одним из которых является ген *DUX4* [80, 81]. Белок *DUX4* является транскрипционным фактором, и его aberrантная экспрессия при МЛД1 является токсичной для клеток [82].

В работе Cabianca и соавт. было установлено, что в мышцах больных МЛД1 в локусе D4Z4 происходит транскрипция днРНК DBE-T (D4Z4 Binding Element-Transcript). При этом у здоровых людей экспрессия данного транскрипта отсутствует. Это связано с тем, что при наличии большого количества повторов D4Z4 происходит активное связывание белков PcG (Polycomb Group) в каждом повторе, что приводит к подавлению транскрипции в данном локусе. В случае уменьшения числа повторов D4Z4 не происходит связывание PcG белков с ДНК, и активируется транскрипция DBE-T. Используя методы иммунопреципитации хроматина (ChIP-qPCR) и РНК (RIP), исследователи установили, что некодирующая РНК DBE-T способна напрямую связываться с белком ASH1L и привлекать его в локус D4Z4. Белок ASH1L входит в состав комплекса TrxG, активность которого приводит к дерепрессии транскрипции в локусе 4q35, в результате чего активируется экспрессия белка *DUX4*, токсичного для мышечных клеток [9].

Известно, что в развитии МЛД1 играет роль не только *DUX4*, но и другие гены, расположенные в локусе 4q35, например *FRG1* (Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) region gene 1) [80]. Поэтому в предыдущих работах по созданию подходов к терапии МЛД1 Wallace и соавт. предложили использовать аденоассоциированную вирусную доставку микроРНК к гену *FRG1* [83]. Однако ясно, что патогенез МЛД1 является сложным процессом, в который вовлечены несколько генов из локуса D4Z4. При этом экспрессия днРНК DBE-T является триггером, запускающим их экспрессию, поэтому можно предположить, что подавление экспрессии днРНК DBE-T является наиболее перспективным подходом к терапии МЛД1 [9], хотя работы по этой теме пока не опубликованы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До недавнего времени считалось, что белки являются единственным конечным продуктом реализации генетической информации. Поэтому и проводившиеся исследования патогенеза заболеваний, и разработка подходов к их лечению были направлены в сторону белок-кодирующих генов. Однако с помощью современных методов анализа был выявлен целый мир длинных некодирующих транскриптов, которые по своему числу и разнообразию не уступают белковому миру. Всестороннее изучение функций днРНК только началось. Но уже ясно, что они вовлечены, по-видимому, в большинство клеточных процессов,

а также участвуют в патогенезе многих заболеваний. При этом оказалось, что для днРНК можно применять ранее разработанные молекулярно-биологические подходы к генной терапии. Залогом успеха для разработок в этом

направлении является глубокое и детальное исследование функций днРНК как в норме, так и при патологии. Это лишний раз демонстрирует важность фундаментальной науки, являющейся базой прикладных исследований.

Литература

- Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, Tapanari E, Diekhans M, Kokocinski E et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* 2012 Sep; 22 (9): 1760–74. DOI: 10.1101/gr.135350.111.
- Kornienko AE, Dotter CP, Guenzi PM, Gisslinger H, Gisslinger B, Cleary C et al. Long non-coding RNAs display higher natural expression variation than protein-coding genes in healthy humans. *Genome Biol.* 2016 Jan 29; 17: 14. DOI: 10.1186/s13059-016-0873-8.
- Leucci E, Vendramin R, Spinazzi M, Laurette P, Fiers M, Wouters J et al. Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature.* 2016 Mar 24; 531 (7595): 518–22. DOI: 10.1038/nature17161.
- Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science.* 2008 Oct 31; 322 (5902): 750–6. DOI: 10.1126/science.1163045.
- Yang L, Lin C, Liu W, Zhang J, Ohgi KA, Grinstein JD et al. ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs. *Cell.* 2011 Nov 11; 147 (4): 773–88.
- Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, Komorowski J et al. Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol Cell.* 2008 Oct 24; 32 (2): 232–46. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.08.022.
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 2007 Jun 29; 129 (7): 1311–23. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.022.
- Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science.* 2010 Aug 6; 329 (5992): 689–93. DOI: 10.1126/science.1192002.
- Cabianca DS, Casa V, Bodega B, Xynos A, Ginelli E, Tanaka Y et al. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy. *Cell.* 2012 May 11; 149 (4): 819–31. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.035.
- Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chinappi M et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell.* 2011 Oct 14; 147 (2): 358–69. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.028.
- Karreth FA, Tay Y, Perna D, Ala U, Tan SM, Rust AG et al. In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell.* 2011 Oct 14; 147 (2): 382–95. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.032.
- Yoon JH, Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, Martindale JL, De S et al. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol Cell.* 2012 Aug 24; 47 (4): 648–55. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.06.027.
- Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med.* 2008 Jul; 14 (7): 723–30. DOI: 10.1038/nm1784.
- Gong C, Maquat LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature.* 2011 Feb 10; 470 (7333): 284–8. DOI: 10.1038/nature09701.
- Spector DL, Lamond AI. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Feb 1; 3 (2). pii: a000646. DOI: 10.1101/cshperspect.a000646.
- Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell.* 2010 Sep 24; 39 (6): 925–38. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.08.011.
- Engreitz JM, Sirokman K, McDonel P, Shishkin AA, Surka C, Russell P et al. RNA-RNA interactions enable specific targeting of noncoding RNAs to nascent Pre-mRNAs and chromatin sites. *Cell.* 2014 Sep 25; 159 (1): 188–99. DOI: 10.1016/j.cell.2014.08.018.
- Chen, Wang Z, Wang D, Qui C, Liu M, Chen X et al. LncRNADisease: a database for long-non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan 1; 41 (Database issue): D983–6. DOI: 10.1093/nar/gks1099.
- Xing Z, Lin A, Li C, Liang K, Wang S, Liu Y et al. lncRNA directs cooperative epigenetic regulation downstream of chemokine signals. *Cell.* 2014 Nov 20; 159 (5): 1110–25. DOI: 10.1016/j.cell.2014.10.013.
- Yoshimoto R, Mayeda A, Yoshida M, Nakagawa S. MALAT1 long non-coding RNA in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jan; 1859 (1): 192–9. DOI: 10.1016/j.bbaggm.2015.09.012.
- Woo CJ, Maier VK, Davey R, Brennan J, Li G, Brothers J 2nd et al. Gene activation of SMN by selective disruption of lncRNA-mediated recruitment of PRC2 for the treatment of spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Feb 21; 114 (8): E1509–E1518. DOI: 10.1073/pnas.1616521114.
- Meng L, Ward AJ, Chun S, Bennett CF, Beaudet AL, Rigo F. Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA. *Nature.* 2015 Feb 19; 518 (7539): 409–12. DOI: 10.1038/nature13975.
- Zernov NV, Marakhonov AV, Vyakhireva JV, Guskova AA, Dadalia EL, Skoblov MY. Clinical and Genetic Characteristics and Diagnostic Features of Landouzy–Dejerine Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Russian Journal of Genetics.* 2017; 53 (6): 640–50.
- Sun M, Liu XH, Wang KM, Nie FQ, Kong R, Yang JS et al. Downregulation of BRAF activated non-coding RNA is associated with poor prognosis for non-small cell lung cancer and promotes metastasis by affecting epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cancer.* 2014 Mar 21; 13: 68. DOI: 10.1186/1476-4598-13-68.
- Pickard MR, Williams GT. Regulation of apoptosis by long non-coding RNA GAS5 in breast cancer cells: implications for chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Jun; 145 (2): 359–70. DOI: 10.1007/s10549-014-2974-y.
- Mourtada-Maarabouni M, Pickard MR, Hedge VL, Farzaneh F, Williams GT. GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. *Oncogene.* 2009 Jan 15; 28 (2): 195–208. DOI: 10.1038/onc.2008.373.
- Cao S, Liu W, Li F, Zhao W, Qin C. Decreased expression of lncRNA GAS5 predicts a poor prognosis in cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 7 (10): 6776–83.
- Chung DW, Rudnicki DD, Yu L, Margolis RL. A natural antisense transcript at the Huntington's disease repeat locus regulates HTT expression. *Hum Mol Genet.* 2011 Sep 1; 20 (17): 3467–77. DOI: 10.1093/hmg/ddr263.
- Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res.* 2012; 1: 27. DOI: 10.4103/2277-9175.98152.
- Zhang F, Zhang L, Zhang C. Long noncoding RNAs and tumorigenesis: genetic associations, molecular mechanisms, and therapeutic strategies. *Tumour Biol.* 2016 Jan; 37 (1): 163–75. DOI: 10.1007/s13277-015-4445-4.
- Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 10; 1489 (1): 31–44.
- Rigo F, Seth PP, Bennett CF. Antisense oligonucleotide-based

- therapies for diseases caused by pre-mRNA processing defects. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 825: 303–52. DOI: 10.1007/978-1-4939-1221-6_9.
33. Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc J.* 2016 Jul; 4 (7): 35–50.
 34. Klug A. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Q Rev Biophys.* 2010 Feb; 43 (1): 1–21. DOI: 10.1017/S003358351000089.
 35. Boch J, Bonas U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol.* 2010; 48: 419–36. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080508-081936.
 36. Nemudnyi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakian SM. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae.* 2014 Jul; 6 (3): 19–40.
 37. Boettcher M, McManus MT. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell.* 2015 May 21; 58 (4): 575–85. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.04.028.
 38. Schaefer KA, Wu WH, Colgan DF, Tsang SH, Bassuk AG, Mahajan VB. Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo. *Nat Methods.* 2017 May 30; 14 (6): 547–8. DOI: 10.1038/nmeth.4293.
 39. Iyer V, Shen B, Zhang W, Hodgkins A, Keane T, Huang X, et al. Off-target mutations are rare in Cas9-modified mice. *Nat Methods.* 2015 Jun; 12 (6): 479. DOI: 10.1038/nmeth.3408.
 40. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell.* 2015 May; 6 (5): 363–72. DOI: 10.1007/s13238-015-0153-5.
 41. Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, E PRI, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods.* 2015 Apr; 12 (4): 326–8. DOI: 10.1038/nmeth.3312.
 42. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell.* 2013 Jul 18; 154 (2): 442–51. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.044.
 43. Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, Fu Y, Ho QH, Joung JK. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods.* 2013 Oct; 10 (10): 977–9. DOI: 10.1038/nmeth.2598.
 44. Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Khabidi AM, Polstein LR, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods.* 2013 Oct; 10 (10): 973–6. DOI: 10.1038/nmeth.2600.
 45. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell.* 2014 Oct 23; 159 (3): 647–61. DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.029.
 46. Meng L, Person RE, Beaudet AL. Ube3a-ATS is an atypical RNA polymerase II transcript that represses the paternal expression of Ube3a. *Hum Mol Genet.* 2012 Jul 1; 21 (13): 3001–12. DOI: 10.1093/hmg/dds130.
 47. Goyal A, Myacheva K, Gross M, Klingenberg M, Duran Arque B, Diederichs S. Challenges of CRISPR/Cas9 applications for long non-coding RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 2017 Feb 17; 45 (3): e12. DOI: 10.1093/nar/gkw883.
 48. Ma L, Chua MS, Andrisani O, So S. Epigenetics in hepatocellular carcinoma: an update and future therapy perspectives. *World J Gastroenterol.* 2014 Jan 14; 20 (2): 333–45. DOI: 10.3748/wjg.v20.i2.333.
 49. Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov.* 2011 Oct; 1 (5): 391–407. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-11-0209.
 50. Pedram Fatemi R, Salah-Uddin S, Modarresi F, Khoury N, Wahlestedt C, Faghihi MA. Screening for Small-Molecule Modulators of Long Noncoding RNA-Protein Interactions Using AlphaScreen. *J Biomol Screen.* 2015 Oct; 20 (9): 1132–41. DOI: 10.1177/1087057115594187.
 51. Fatima R, Akhade VS, Pal D, Rao SM. Long noncoding RNAs in development and cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. *Mol Cell Ther.* 2015; 3: 5. DOI: 10.1186/s40591-015-0042-6.
 52. Zhou X, Ren Y, Zhang J, Zhang C, Zhang K, Han L et al. HOTAIR is a therapeutic target in glioblastoma. *Oncotarget.* 2015 Apr 10; 6 (10): 8353–65. DOI: 10.18632/oncotarget.3229.
 53. Rubio-Rodríguez D, De Diego Blanco S, Perez M, Rubio-Terres C. Cost-Effectiveness of Drug Treatments for Advanced Melanoma: A Systematic Literature Review. *Pharmacoeconomics.* 2017 May 27. DOI: 10.1007/s40273-017-0517-1.
 54. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2017 [Интернет]. Atlanta, Georgia: American Cancer Society; 2017 [процитировано: июнь 2017 г.]. Доступно по ссылке: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>
 55. Godinho M, Meijer D, Setyono-Han B, Dorssers LC, van Aghthoven T. Characterization of BCAR4, a novel oncogene causing endocrine resistance in human breast cancer cells. *J Cell Physiol.* 2011 Jul; 226 (7): 1741–9. DOI: 10.1002/jcp.22503.
 56. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature.* 2010 Apr 15; 464 (7291): 1071–6. DOI: 10.1038/nature08975.
 57. Yu X, Li Z. Long non-coding RNA HOTAIR: A novel oncogene (Review). *Mol Med Rep.* 2015 Oct; 12 (4): 5611–8. DOI: 10.3892/mmr.2015.4161.
 58. Li D, Feng J, Wu T, Wang Y, Sun Y, Ren J, et al. Long intergenic noncoding RNA HOTAIR is overexpressed and regulates PTEN methylation in laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2013 Jan; 182 (1): 64–70. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.08.042.
 59. Ji P, Diederichs S, Wang W, Boing S, Metzger R, Schneider PM, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene.* 2003 Sep 11; 22 (39): 8031–41. DOI: 10.1038/sj.onc.1206928.
 60. Gutschner T, Hammerle M, Eissmann M, Hsu J, Kim Y, Hung G et al. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Res.* 2013 Feb 1; 73 (3): 1180–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2850.
 61. Nakagawa S, Ip JY, Shioi G, Tripathi V, Zong X, Hirose T et al. Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice. *RNA.* 2012 Aug; 18 (8): 1487–99. DOI: 10.1261/ma.033217.112.
 62. Tano K, Mizuno R, Okada T, Rakwal R, Shibato J, Masuo Y et al. MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS letters.* 2010 Nov 19; 584 (22): 4575–80. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.10.008.
 63. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991 Oct; 12 (10): 383–8.
 64. St George-Hyslop P, Haass C. Regulatory RNA goes awry in Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2008 Jul; 14 (7): 711–2. DOI: 10.1038/nm0708-711.
 65. Modarresi F, Faghihi MA, Patel NS, Sahagan BG, Wahlestedt C, Lopez-Toledano MA. Knockdown of BACE1-AS Nonprotein-Coding Transcript Modulates Beta-Amyloid-Related Hippocampal Neurogenesis. *Int J Alzheimers Dis.* 2011; 2011: 929042. DOI: 10.4621/2011/929042.
 66. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat.* 2000; 15 (3): 228–37.
 67. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 1995 Jan 13; 80 (1): 155–65.
 68. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 May 25; 96 (11): 6307–11.
 69. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet.* 1999 Jul; 8 (7): 1177–83.
 70. Fang P, Li L, Zeng J, Zhou WJ, Wu WQ, Zhong ZY et al. Molecular characterization and copy number of SMN1, SMN2 and NAIP in Chinese patients with spinal muscular atrophy and unrelated healthy controls. *BMC musculoskelet Disord.* 2015 Feb 7; 16: 11.

- DOI: 10.1186/s12891-015-0457-x.
71. Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet.* 2002 Feb; 70 (2): 358–68. DOI: 10.1086/338627.
 72. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal Muscular Atrophy. *Neurol Clin.* 2015 Nov; 33 (4): 831–46. DOI: 10.1016/j.ncl.2015.07.004.
 73. Porensky PN, Burghes AH. Antisense oligonucleotides for the treatment of spinal muscular atrophy. *Hum Gene Ther.* 2013 May; 24 (5): 489–98. DOI: 10.1089/hum.2012.225.
 74. Walker FO. Huntington's disease. *Lancet.* 2007 Jan 20; 369 (9557): 218–28. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60111-1.
 75. Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet.* 1993 Aug; 4 (4): 387–92.
 76. Petersen MB, Brøndum-Nielsen K, Hansen LK, Wulff K. Clinical, cytogenetic, and molecular diagnosis of Angelman syndrome: estimated prevalence rate in a Danish county. *Am J Med Genet.* 1995 Jun 19; 60 (3): 261–2.
 77. Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kieffmann M, Horsthemke B, Buiting K. The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet.* 2001 Nov 1; 10 (23): 2687–700.
 78. Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, et al. Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of Ube3a. *Hum Mol Genet.* 2003 Apr 15; 12 (8): 837–47.
 79. Вяхирева Ю. В., Зернов Н. В., Марахонов А. В., Гуськова А. А., Скоблов М. Ю. Современные подходы к лечению миодистрофий. *Медицинская генетика.* 2016; 15 (10): 3–16.
 80. Bodega B, Ramirez GD, Grasser F, Cheli S, Brunelli S, Mora M, et al. Remodeling of the chromatin structure of the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) locus and upregulation of FSHD-related gene 1 (FRG1) expression during human myogenic differentiation. *BMC biology.* 2009 Jul 16; 7: 41. DOI: 10.1186/1741-7007-7-41.
 81. Gabellini D, Green MR, Tupler R. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell.* 2002 Aug 9; 110 (3): 339–48.
 82. Kowalajow V, Marcowycz A, Anseau E, Conde CB, Sauvage S, Matteotti C, et al. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord.* 2007 Aug; 17 (8): 611–23. DOI: 10.1016/j.nmd.2007.04.002.
 83. Wallace LM, Garwick-Coppens SE, Tupler R, Harper SQ. RNA interference improves myopathic phenotypes in mice over-expressing FSHD region gene 1 (FRG1). *Mol Ther.* 2011 Nov; 19 (11): 2048–54. DOI: 10.1038/mt.2011.118.

References

1. Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, Tapanari E, Diekhans M, Kokocinski E et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* 2012 Sep; 22 (9): 1760–74. DOI: 10.1101/gr.135350.111.
2. Kornienko AE, Dotter CP, Guenzl PM, Gisslinger H, Gisslinger B, Cleary C et al. Long non-coding RNAs display higher natural expression variation than protein-coding genes in healthy humans. *Genome Biol.* 2016 Jan 29; 17: 14. DOI: 10.1186/s13059-016-0873-8.
3. Leucci E, Vendramin R, Spinazzi M, Laurette P, Fiers M, Wouters J et al. Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature.* 2016 Mar 24; 531 (7595): 518–22. DOI: 10.1038/nature17161.
4. Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science.* 2008 Oct 31; 322 (5902): 750–6. DOI: 10.1126/science.1163045.
5. Yang L, Lin C, Liu W, Zhang J, Ohgi KA, Grinstein JD et al. ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs. *Cell.* 2011 Nov 11; 147 (4): 773–88.
6. Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, Komorowski J et al. Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol Cell.* 2008 Oct 24; 32 (2): 232–46. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.08.022.
7. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 2007 Jun 29; 129 (7): 1311–23. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.022.
8. Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science.* 2010 Aug 6; 329 (5992): 689–93. DOI: 10.1126/science.1192002.
9. Cabianca DS, Casa V, Bodega B, Xynos A, Ginelli E, Tanaka Y et al. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy. *Cell.* 2012 May 11; 149 (4): 819–31. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.035.
10. Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chinappi M et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell.* 2011 Oct 14; 147 (2): 358–69. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.028.
11. Karreth FA, Tay Y, Perna D, Ala U, Tan SM, Rust AG et al. In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell.* 2011 Oct 14; 147 (2): 382–95. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.032.
12. Yoon JH, Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, Martindale JL, De S et al. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol Cell.* 2012 Aug 24; 47 (4): 648–55. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.06.027.
13. Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med.* 2008 Jul; 14 (7): 723–30. DOI: 10.1038/nm1784.
14. Gong C, Maquat LE. IncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature.* 2011 Feb 10; 470 (7333): 284–8. DOI: 10.1038/nature09701.
15. Spector DL, Lamond AI. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Feb 1; 3 (2). pii: a000646. DOI: 10.1101/cshperspect.a000646.
16. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell.* 2010 Sep 24; 39 (6): 925–38. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.08.011.
17. Engreitz JM, Sirokman K, McDonel P, Shishkin AA, Surka C, Russell P et al. RNA-RNA interactions enable specific targeting of noncoding RNAs to nascent Pre-mRNAs and chromatin sites. *Cell.* 2014 Sep 25; 159 (1): 188–99. DOI: 10.1016/j.cell.2014.08.018.
18. Chen, Wang Z, Wang D, Qui C, Liu M, Chen X et al. LncRNADisease: a database for long-non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan 1; 41 (Database issue): D983–6. DOI: 10.1093/nar/gks1099.
19. Xing Z, Lin A, Li C, Liang K, Wang S, Liu Y et al. IncRNA directs cooperative epigenetic regulation downstream of chemokine signals. *Cell.* 2014 Nov 20; 159 (5): 1110–25. DOI: 10.1016/j.cell.2014.10.013.
20. Yoshimoto R, Mayeda A, Yoshida M, Nakagawa S. MALAT1 long non-coding RNA in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jan; 1859 (1): 192–9. DOI: 10.1016/j.bbaggm.2015.09.012.
21. Woo CJ, Maier VK, Davey R, Brennan J, Li G, Brothers J 2nd et al. Gene activation of SMN by selective disruption of lncRNA-mediated recruitment of PRC2 for the treatment of spinal

- muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Feb 21; 114 (8): E1509–E1518. DOI: 10.1073/pnas.1616521114.
22. Meng L, Ward AJ, Chun S, Bennett CF, Beaudet AL, Rigo F. Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA. *Nature*. 2015 Feb 19; 518 (7539): 409–12. DOI: 10.1038/nature13975.
 23. Zernov NV, Marakhonov AV, Vyakhireva JV, Guskova AA, Dadalia EL, Skoblov MY. Clinical and Genetic Characteristics and Diagnostic Features of Landouzy–Dejerine Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Russian Journal of Genetics*. 2017; 53 (6): 640–50.
 24. Sun M, Liu XH, Wang KM, Nie FQ, Kong R, Yang JS et al. Downregulation of BRAF activated non-coding RNA is associated with poor prognosis for non-small cell lung cancer and promotes metastasis by affecting epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cancer*. 2014 Mar 21; 13: 68. DOI: 10.1186/1476-4598-13-68.
 25. Pickard MR, Williams GT. Regulation of apoptosis by long non-coding RNA GAS5 in breast cancer cells: implications for chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Jun; 145 (2): 359–70. DOI: 10.1007/s10549-014-2974-y.
 26. Mourtada-Maarabouni M, Pickard MR, Hedge VL, Farzaneh F, Williams GT. GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. *Oncogene*. 2009 Jan 15; 28 (2): 195–208. DOI:10.1038/onc.2008.373.
 27. Cao S, Liu W, Li F, Zhao W, Qin C. Decreased expression of lncRNA GAS5 predicts a poor prognosis in cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7 (10): 6776–83.
 28. Chung DW, Rudnicki DD, Yu L, Margolis RL. A natural antisense transcript at the Huntington's disease repeat locus regulates HTT expression. *Hum Mol Genet*. 2011 Sep 1; 20 (17): 3467–77. DOI: 10.1093/hmg/ddr263.
 29. Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res*. 2012; 1: 27. DOI: 10.4103/2277-9175.98152.
 30. Zhang F, Zhang L, Zhang C. Long noncoding RNAs and tumorigenesis: genetic associations, molecular mechanisms, and therapeutic strategies. *Tumour Biol*. 2016 Jan; 37 (1): 163–75. DOI: 10.1007/s13277-015-4445-4.
 31. Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Dec 10; 1489 (1): 31–44.
 32. Rigo F, Seth PP, Bennett CF. Antisense oligonucleotide-based therapies for diseases caused by pre-mRNA processing defects. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 825: 303–52. DOI: 10.1007/978-1-4939-1221-6_9.
 33. Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc J*. 2016 Jul; 4 (7): 35–50.
 34. Klug A. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Q Rev Biophys*. 2010 Feb; 43 (1): 1–21. DOI: 10.1017/S003358351000089.
 35. Boch J, Bonas U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol*. 2010; 48: 419–36. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080508-081936.
 36. Nemudryi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakian SM. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae*. 2014 Jul; 6 (3): 19–40.
 37. Boettcher M, McManus MT. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell*. 2015 May 21; 58 (4): 575–85. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.04.028.
 38. Schaefer KA, Wu WH, Colgan DF, Tsang SH, Bassuk AG, Mahajan VB. Unexpected mutations after CRISPR–Cas9 editing in vivo. *Nat Methods*. 2017 May 30; 14 (6): 547–8. DOI: 10.1038/nmeth.4293.
 39. Iyer V, Shen B, Zhang W, Hodgkins A, Keane T, Huang X, et al. Off-target mutations are rare in Cas9-modified mice. *Nat Methods*. 2015 Jun; 12 (6): 479. DOI: 10.1038/nmeth.3408.
 40. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell*. 2015 May; 6 (5): 363–72. DOI: 10.1007/s13238-015-0153-5.
 41. Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, E PRI, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*. 2015 Apr; 12 (4): 326–8. DOI: 10.1038/nmeth.3312.
 42. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 2013 Jul 18; 154 (2): 442–51. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.044.
 43. Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, Fu Y, Ho QH, Joung JK. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*. 2013 Oct; 10 (10): 977–9. DOI: 10.1038/nmeth.2598.
 44. Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods*. 2013 Oct; 10 (10): 973–6. DOI: 10.1038/nmeth.2600.
 45. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*. 2014 Oct 23; 159 (3): 647–61. DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.029.
 46. Meng L, Person RE, Beaudet AL. Ube3a-ATS is an atypical RNA polymerase II transcript that represses the paternal expression of Ube3a. *Hum Mol Genet*. 2012 Jul 1; 21 (13): 3001–12. DOI: 10.1093/hmg/dds130.
 47. Goyal A, Myacheva K, Gross M, Klingenberg M, Duran Arque B, Diederichs S. Challenges of CRISPR/Cas9 applications for long non-coding RNA genes. *Nucleic Acids Res*. 2017 Feb 17; 45 (3): e12. DOI: 10.1093/nar/gkw883.
 48. Ma L, Chua MS, Andrisani O, So S. Epigenetics in hepatocellular carcinoma: an update and future therapy perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014 Jan 14; 20 (2): 333–45. DOI: 10.3748/wjg.v20.i2.333.
 49. Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov*. 2011 Oct; 1 (5): 391–407. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-11-0209.
 50. Pedram Fatemi R, Salah-Uddin S, Modarresi F, Khoury N, Wahlestedt C, Faghihi MA. Screening for Small-Molecule Modulators of Long Noncoding RNA-Protein Interactions Using AlphaScreen. *J Biomol Screen*. 2015 Oct; 20 (9): 1132–41. DOI: 10.1177/1087057115594187.
 51. Fatima R, Akhade VS, Pal D, Rao SM. Long noncoding RNAs in development and cancer: potential biomarkers and therapeutic targets. *Mol Cell Ther*. 2015; 3: 5. DOI: 10.1186/s40591-015-0042-6.
 52. Zhou X, Ren Y, Zhang J, Zhang C, Zhang K, Han L et al. HOTAIR is a therapeutic target in glioblastoma. *Oncotarget*. 2015 Apr 10; 6 (10): 8353–65. DOI: 10.18632/oncotarget.3229.
 53. Rubio-Rodriguez D, De Diego Blanco S, Perez M, Rubio-Terres C. Cost-Effectiveness of Drug Treatments for Advanced Melanoma: A Systematic Literature Review. *Pharmacoeconomics*. 2017 May 27. DOI: 10.1007/s40273-017-0517-1.
 54. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2017 [Internet]. Atlanta, Georgia: American Cancer Society; 2017 [cited 2017 Jun]. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>
 55. Godinho M, Meijer D, Setyono-Han B, Dorssers LC, van Agthoven T. Characterization of BCAR4, a novel oncogene causing endocrine resistance in human breast cancer cells. *J Cell Physiol*. 2011 Jul; 226 (7): 1741–9. DOI: 10.1002/jcp.22503.
 56. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. 2010 Apr 15; 464 (7291): 1071–6. DOI: 10.1038/nature08975.
 57. Yu X, Li Z. Long non-coding RNA HOTAIR: A novel oncogene (Review). *Mol Med Rep*. 2015 Oct; 12 (4): 5611–8. DOI: 10.3892/mmr.2015.4161.
 58. Li D, Feng J, Wu T, Wang Y, Sun Y, Ren J, et al. Long intergenic noncoding RNA HOTAIR is overexpressed and regulates PTEN methylation in laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2013 Jan; 182 (1): 64–70. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.08.042.
 59. Ji P, Diederichs S, Wang W, Boing S, Metzger R, Schneider PM, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2003 Sep 11; 22 (39): 8031–41. DOI: 10.1038/sj.onc.1206928.
 60. Gutschner T, Hammerle M, Eissmann M, Hsu J, Kim Y, Hung G et al. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the

- metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Res.* 2013 Feb 1; 73 (3): 1180–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2850.
61. Nakagawa S, Ip JY, Shioi G, Tripathi V, Zong X, Hirose T et al. Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice. *RNA.* 2012 Aug; 18 (8): 1487–99. DOI: 10.1261/rna.033217.112.
 62. Tano K, Mizuno R, Okada T, Rakwal R, Shibato J, Masuo Y et al. MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS letters.* 2010 Nov 19; 584 (22): 4575–80. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.10.008.
 63. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991 Oct; 12 (10): 383–8.
 64. St George-Hyslop P, Haass C. Regulatory RNA goes awry in Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2008 Jul; 14 (7): 711–2. DOI: 10.1038/nm0708-711.
 65. Modarresi F, Faghihi MA, Patel NS, Sahagan BG, Wahlestedt C, Lopez-Toledano MA. Knockdown of BACE1-AS Nonprotein-Coding Transcript Modulates Beta-Amyloid-Related Hippocampal Neurogenesis. *Int J Alzheimers Dis.* 2011; 2011: 929042. DOI: 10.4621/2011/929042.
 66. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat.* 2000; 15 (3): 228–37.
 67. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 1995 Jan 13; 80 (1): 155–65.
 68. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 May 25; 96 (11): 6307–11.
 69. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burgles AH et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet.* 1999 Jul; 8 (7): 1177–83.
 70. Fang P, Li L, Zeng J, Zhou WJ, Wu WQ, Zhong ZY et al. Molecular characterization and copy number of SMN1, SMN2 and NAIP in Chinese patients with spinal muscular atrophy and unrelated healthy controls. *BMC musculoskelet Disord.* 2015 Feb 7; 16: 11. DOI: 10.1186/s12891-015-0457-x.
 71. Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet.* 2002 Feb; 70 (2): 358–68. DOI: 10.1086/338627.
 72. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal Muscular Atrophy. *Neurol Clin.* 2015 Nov; 33 (4): 831–46. DOI: 10.1016/j.ncl.2015.07.004.
 73. Porensky PN, Burghes AH. Antisense oligonucleotides for the treatment of spinal muscular atrophy. *Hum Gene Ther.* 2013 May; 24 (5): 489–98. DOI: 10.1089/hum.2012.225.
 74. Walker FO. Huntington's disease. *Lancet.* 2007 Jan 20; 369 (9557): 218–28. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60111-1.
 75. Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet.* 1993 Aug; 4 (4): 387–92.
 76. Petersen MB, Brøndum-Nielsen K, Hansen LK, Wulff K. Clinical, cytogenetic, and molecular diagnosis of Angelman syndrome: estimated prevalence rate in a Danish county. *Am J Med Genet.* 1995 Jun 19; 60 (3): 261–2.
 77. Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kieffmann M, Horsthemke B, Buiting K. The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet.* 2001 Nov 1; 10 (23): 2687–700.
 78. Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, et al. Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of Ube3a. *Hum Mol Genet.* 2003 Apr 15; 12 (8): 837–47.
 79. Vyakhireva JV, Zernov NV, Marakhonov AV, Guskova AA, Skoblov MYu. [Current approaches for treatment of muscular dystrophies]. *Meditinskaya genetika.* 2016; 15(10): 3–16. Russian.
 80. Bodega B, Ramirez GD, Grasser F, Cheli S, Brunelli S, Mora M, et al. Remodeling of the chromatin structure of the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) locus and upregulation of FSHD-related gene 1 (FRG1) expression during human myogenic differentiation. *BMC biology.* 2009 Jul 16; 7: 41. DOI: 10.1186/1741-7007-7-41.
 81. Gabellini D, Green MR, Tupler R. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell.* 2002 Aug 9; 110 (3): 339–48.
 82. Kowaljow V, Marcowycz A, Ansseau E, Conde CB, Sauvage S, Matteotti C, et al. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord.* 2007 Aug; 17 (8): 611–23. DOI: 10.1016/j.nmd.2007.04.002.
 83. Wallace LM, Garwick-Coppens SE, Tupler R, Harper SQ. RNA interference improves myopathic phenotypes in mice over-expressing FSHD region gene 1 (FRG1). *Mol Ther.* 2011 Nov; 19 (11): 2048–54. DOI: 10.1038/mt.2011.118.

НОКДАУН ГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК

Ю. В. Вяхирева¹, А. Ю. Филатова¹, И. А. Кривошеева¹, М. Ю. Скоблов^{1,2,3} ✉

¹ Лаборатория функциональной геномики,
Медико-генетический научный центр, Москва

² Лаборатория медицинских генетических технологий, отдел фундаментальных исследований НИМСИ,
Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова, Москва

³ Лаборатория функционального анализа генома,
Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

РНК-интерференция активно используется для решения различных исследовательских задач в биологии и медицине, в частности, для исследования функции генов. Один из распространенных подходов — нокдаун генов с помощью малых интерферирующих РНК (siРНК). Однако единого протокола для этого метода не существует, и данные, получаемые при использовании различных его вариаций, часто обладают низкой воспроизводимостью. В работе обсуждаются теоретические основы указанного метода и приводятся практические рекомендации для постановки экспериментов по нокдауну генов с siРНК.

Ключевые слова: РНК-интерференция, нокдаун, экспрессия генов

✉ **Для корреспонденции:** Скоблов Михаил Юрьевич
ул. Москворечье, д. 1, Москва, 115478; mskoblov@gmail.com

Статья получена: 25.06.2017 **Статья принята к печати:** 28.06.2017

SIRNA-MEDIATED GENE SILENCING

Vyakhireva JV¹, Filatova, AYu¹, Krivosheeva, IA¹, Skoblov MYu^{1,2,3} ✉

¹ Laboratory of Functional Genomics,
Research Centre of Medical Genetics, Moscow, Russia

² Laboratory of Medical and Genetic Technologies, Department of Basic Research of Research Institute for Medicine and Dentistry,
Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

³ Laboratory of Functional Analysis of the Genome,
Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russia

RNA-interference enjoys a wide range of applications in medical and biological research. In particular, it is used to study functions of genes. One of the most popular approaches to this task is gene knockdown by small interfering RNA (siRNA). Currently there is no unified protocol for this method, which results in low reproducibility of experimental data. In the following article we outline the theoretical bases for this method and provide practical recommendations for its use in siRNA-mediated gene silencing experiments.

Keywords: RNA-interference, knockdown, gene expression

✉ **Correspondence should be addressed:** Mikhail Skoblov
ul. Moskvorechie, d. 1, Moscow, Russia, 115478; mskoblov@gmail.com

Received: 25.06.2017 **Accepted:** 28.06.2017

В геноме человека насчитывается 19 817 белок-кодирующих генов и 15 787 генов длинных некодирующих РНК [1]. При этом примерно функции 40 % белок-кодирующих генов неизвестны. Длинные некодирующие РНК являются и вовсе неизученными: всего лишь около сотни из них хорошо исследованы экспериментально [2–5]. Одними из самых простых и эффективных подходов к изучению функции генов являются эксперименты по их оверэкспрессии и нокдауну, при которых исследуются вызываемые ими эффекты как на молекулярном, так и на клеточном уровне.

Подходы по оверэкспрессии генов возникли с развитием методов геной инженерии и молекулярного клонирования. Разработано множество различных способов усилить экспрессию гена, как простых — через создание экс-

прессионных конструкций на основе плазмид, так и сложных — на основе индуцибельных систем, вирусных векторов и др. [6]. Подходы к подавлению экспрессии генов появились позже. Первым инструментом стали антисмысловые олигонуклеотиды [7, 8], которые, однако, сначала не были высокоэффективными. Революцией в молекулярной биологии стало открытие механизма РНК-интерференции — специфического посттранскрипционного подавления экспрессии гена, опосредованного малыми молекулами РНК, так называемыми эндогенными микроРНК (miRNA) и экзогенными малыми интерферирующими РНК (siРНК) [9]. Использование siРНК оказалось настолько простым и эффективным, что за короткое время нокдаун генов с их использованием стал применяться повсеместно — как

в фундаментальных исследованиях по установлению функции генов, так и в прикладных работах по разработке геноспецифических препаратов [10–14].

На сегодняшний день существует две стратегии нокдауна генов с использованием РНК-интерференции: 1) использование siРНК и 2) использование вектора, содержащего последовательность малых шпилечных РНК (shРНК) [15].

Малая интерферирующая РНК — это двуцепочечная молекула РНК длиной 20–25 нуклеотидов с двумя неспаренными нуклеотидами на 3'-конце каждой цепи. Попадая в клетку, она встраивается в комплекс RISC (RNA-induced silencing complex), после чего происходит удаление из комплекса одной из цепей siРНК (цепи-спутницы, passenger strand). Оставшаяся цепь (ведущая, guide strand) связывается по принципу комплементарности со своей РНК-мишенью, и, если комплементарность полная, происходит разрезание целевой РНК, что приводит к деградации мРНК и снижению уровня экспрессии гена [16–18]. Малые шпилечные РНК — это короткие молекулы РНК, образующие шпилечную структуру. Стебель такой шпильки имеет длину 19–22 пар нуклеотидов, а петля — 4–11 нуклеотидов. shРНК является предшественником siРНК в клетке. Последовательность shРНК доставляется в клетки в составе экспрессионного бактериального или вирусного вектора.

По сравнению с siРНК shРНК имеют ряд преимуществ: более продолжительное воздействие на экспрессию гена-мишени; возможность интеграции вектора в геном и получение клеток, стабильно экспрессирующих shРНК; возможность создания индуцибельных систем нокдауна; возможность одновременной экспрессии с репортерным геном для контроля эффективности трансфекции и отбора трансфицированных клеток. С другой стороны, использование shРНК требует больших трудозатрат. Поэтому если по условиям эксперимента достаточно краткосрочного (5–7 дней) [19] снижения уровня экспрессии исследуемого гена, то следует использовать siРНК.

Однако сам нокдаун с помощью siРНК является многостадийным процессом, выполнение которого занимает около недели. Отсутствие стандартного протокола нокдауна и широкая доступность метода привели к тому, что в настоящее время публикуются данные, полученные в результате применения значительно различающихся методик. Более того, многие исследователи не указывают подробности проведения экспериментов [20–22], что, конечно, приводит к низкой воспроизводимости результатов. Качество работы на каждом этапе нокдауна может существенно влиять на результаты. Например, в статьях достаточно редко указывают эффективность трансфекции siРНК, а от этого зависит эффективность нокдауна и проявление последующих эффектов. В эксперименте большое значение имеют и количество трансфицируемых клеток, и уровень экспрессии целевого гена, не говоря уже о техниках выполнения базовых операций — выделении РНК, проведении реакции обратной транскрипции, проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени» и др., выполняемых в разных лабораториях по-разному.

В данной работе рассматривается вся схема проведения нокдауна с помощью siРНК (рис. 1). Обсуждаются потенциальные сложности каждого этапа и пути их преодоления. Приводится пример методики, которая используется в лаборатории функциональной геномики Медико-генетического научного центра (Москва). Важно отметить, что для каждого этапа приведены контроли, которые не-

обходимы для оценки правильности выполнения методик. Мы надеемся, что данная методика станет опорой в постановке нокдауна новых, неизученных генов как для студента, так и для научного сотрудника, и приведет к получению качественных результатов для публикации в высоко цитируемых журналах.

I. Дизайн эксперимента

1. Корректная постановка задачи

Перед началом работы по нокдауну интересующего гена в клеточной культуре необходимо проанализировать литературу и доступные в интернете баз данных, чтобы выбрать биологическую модель для исследования и определить нуклеотидную последовательность изучаемого гена.

Подходящая биологическая модель. Необходимо оценить уровень экспрессии исследуемого гена в предполагаемых клеточных культурах. Информацию об экспрессии генов в различных тканях и клеточных линиях можно найти

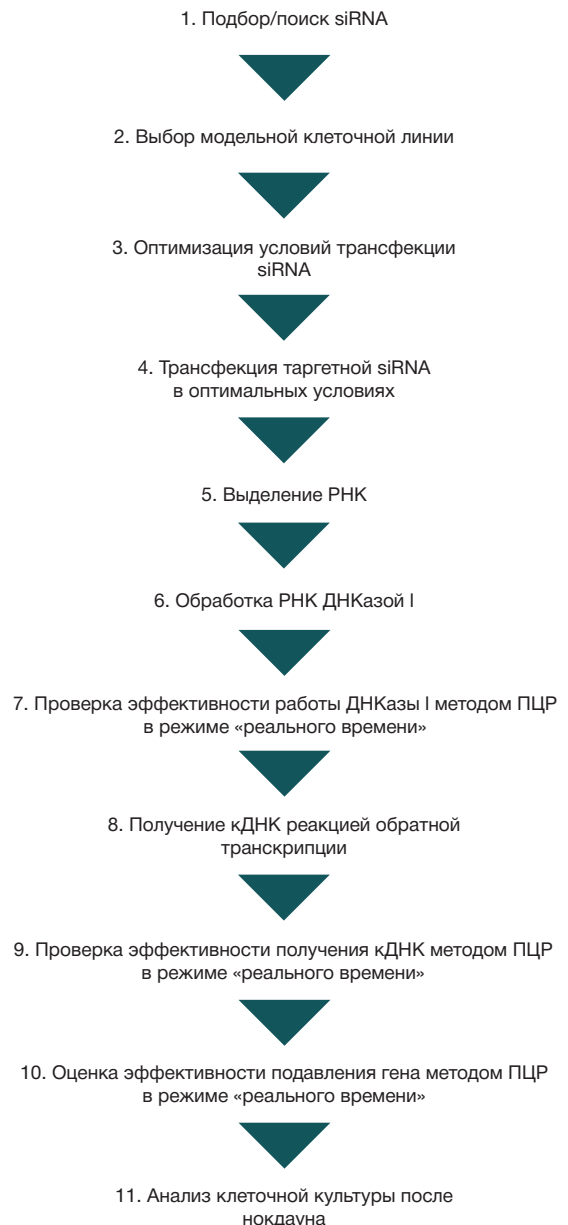


Рис. 1. Схема эксперимента по нокдауну

в таких базах данных, как FANTOM5, GTExPortal, BioGPS, Human Protein Atlas; данные RNA-seq — в геномном браузере UCSC. По возможности следует выбирать клеточную модель с достаточно высокой экспрессией исследуемого гена, т. к. нокдаун генов, изначально экспрессирующихся на очень низком уровне, может быть неэффективен. Кроме того, необходимо предварительно экспериментально оценить уровень экспрессии исследуемого гена в реально используемой биологической модели при помощи ПЦР в режиме «реального времени».

Анализ последовательности гена. siRNA должна взаимодействовать с уникальным участком гена. Поэтому перед тем, как осуществлять дизайн siRNA, необходимо понять, насколько последовательность мРНК анализируемого гена подходит для специфичного нокдауна. В этом вопросе могут помочь широко распространенные инструменты анализа нуклеотидных последовательностей, такие как BLAST и геномные браузеры (например, UCSC). С их помощью следует определить, имеет ли данный ген псевдогены или высокоомологичные паралоги; содержатся ли в последовательности повторы; сколько изоформ существует у этого гена.

2. Дизайн siRNA

При существующих на сегодняшний день подходах дизайн siRNA сводится к выбору оптимального сайта связывания с последовательностью РНК-мишени. Этот сайт связывания соответствует смысловой цепи siRNA. Антисмысловая цепь является комплементарной смысловой, и именно она образует стабильную связь с комплексом RISC. Не существует единого алгоритма для выбора наиболее эффективной последовательности siRNA [23, 24]. Доступные онлайн-программы, основанные на различных принципах подбора (эмпирические правила, данные BLAST, нейросети), могут давать различные результаты при анализе одной и той же последовательности РНК-мишени [16, 23, 25].

После анализа последовательности изучаемого гена программой пользователю выдается список siRNA, из которых необходимо выбрать 3–4 лучших. Ниже приведены основные правила дизайна siRNA.

1. Длина последовательности — 20–25 нуклеотидов (обычно — 21–23 нуклеотида).
2. Содержание G/C-нуклеотидов — 35–55 %.
3. 5'-конец антисмысловой цепи siRNA должен содержать больше A/U-нуклеотидов, т. к. известно, что с комплексом RISC эффективнее связывается та цепь siRNA, которая имеет менее термодинамически стабильный 5'-конец.
4. На 3'-конец каждой цепи siRNA должен быть добавлен неспаренный дезоксидинуклеотид dTdT. Это делается для увеличения стабильности дуплекса и эффективности загрузки siRNA в комплекс RISC.
5. siRNA должна быть специфичной. Это означает, что при анализе последовательности siRNA с помощью BLAST не должны обнаруживаться транскрипты других генов, полностью комплементарные выбранной siRNA.
6. Комплементарность siRNA с другими транскриптами не должна быть больше 16 нуклеотидов подряд.
7. siRNA должна подавлять экспрессию всех изоформ транскриптов выбранного гена, если по условиям эксперимента не стоит другая задача.
8. siRNA не должна иметь в своем составе повторов нуклеотидных мотивов и большого количества одинаковых нуклеотидов, идущих подряд (больше 3).
9. Существует ряд эмпирических правил, соблюдение которых позволяет увеличить эффективность работы siRNA. Например, необходимо стремиться к тому, чтобы последовательность siRNA содержала конкретные нуклеотиды в определенной позиции в соответствии с табл. 1. Более подробно ознакомиться с правилами дизайна siRNA можно в работе Lagana и соавт. [26]. Список некоторых программ по подбору siRNA, доступных на сегодняшний день, представлен в табл. 2.

Таблица 1. Правила позиционирования нуклеотидов в составе siRNA. AS — антисмысловая цепь siRNA, S — смысловая цепь siRNA. Серые клетки обозначают позиции нуклеотидов в последовательности siRNA (Lagana и соавт., [26])

AS	3'	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	5'
	G/T			G/C no A	C no A no G	no A			U no G	U no G		U	A			U no C				no C	U	A/U	
		G/C no U		A no C		no C	A/U	no C	U no G		A/U no C	no G		G/C no G	no G		A	no G			A/U no G no C	no C	G/T
S	5'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	3'

Таблица 2. Список наиболее известных программ по подбору siRNA

Программа	URL	Ссылка
OptiRNAi 2.0	http://rna.nci.nih.gov	[27]
siDirect 2	http://sidirect2.rnai.jp	[28]
siRNA Scales	http://gesteland.genetics.utah.edu/siRNA_scales	[29]
siExplorer	http://rna.chem.t.u-tokyo.ac.jp/cgi/siexplorer.htm	[30]
RFRCDDB-siRNA	http://www.bioinf.seu.edu.cn/siRNA/index.htm	[31]
OligoWalk	http://rna.urmc.rochester.edu/cgi-bin/server_exe/oligowalk/oligowalk_form.cgi	[32]
Sfold	http://sfold.wadsworth.org	[33]
DSIR	http://biodev.cea.fr/DSIR/	[34]
siRNA Scan	http://bioinfo2.noble.org/RNAiScan.htm	[35]
RNAxs	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAxs/RNAxs.cgi	[36]
i-Score	http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/i_Score/i_score.html	[37]

3. Необходимые контроли

Контроль эффективности доставки siРНК в клетку. Проводится при помощи неспецифической siРНК, меченной флуоресцентной меткой. Мы используем siРНК, меченную флуоресцентным красителем FAM на 5'-конце каждой цепи siFlu.

Отрицательный контроль для оценки специфичности нокдауна и вызываемых им побочных изменений в клетке. Таким контролем является неспецифическая siРНК, не влияющая на экспрессию генов в клетке. Многие фирмы-производители предоставляют готовые к использованию неспецифические siРНК (например, Negative control siRNA от Qiagen, Германия, или Silencer Negative Control от Invitrogen, США). Другим подходом к проведению отрицательного контроля является использование scramble siРНК. Такая siРНК имеет тот же нуклеотидный состав, что и целевая, но другую последовательность. Однако такой подход требует создания в каждом эксперименте нового контроля, для которого необходимо подтверждать отсутствие нецелевого эффекта, что является затруднительным при проведении большого количества экспериментов по нокдауну. Поэтому мы в своей работе используем неспецифическую siРНК, последовательность которой была получена из открытого источника — control siMax siRNAs [38].

Положительный контроль позволяет быть уверенным в правильности проведения эксперимента. Положительным контролем служат молекулы siРНК с подтвержденной высокой эффективностью нокдауна (> 70 %) хорошо детектируемых генов. Примером положительного контроля могут являться эффективные siРНК к генам p53, GAPDH, ламинам. Последовательность таких siРНК можно найти в литературе или воспользоваться коммерческими предложениями различных фирм.

Контроли качества проведения методик на всех этапах нокдауна: выделения РНК, обработки РНК ДНКазой I, получения кДНК, проведения ПЦР в режиме «реального времени». Постановка данных контролей будет описана в соответствующих разделах статьи.

II. Доставка siРНК в клетки

Наиболее часто используемыми подходами к доставке siРНК в клетки являются химическая трансфекция и электропорация. Существует ряд методик химической трансфекции, но наиболее распространенной является липофекция — трансфекция с использованием катионных липосом [11, 39–41]. Достоинствами данной методики являются высокая воспроизводимость и простота исполнения при достаточно высокой эффективности. К недостаткам можно отнести то, что липофекция эффективна в отношении делящихся клеток и малоэффективна в отношении неделящихся, поэтому при работе с некоторыми «труднотрансфицируемыми» культурами клеток (медленно делящимися или первичными) ее эффективность может быть недостаточной. В таком случае оптимальной методикой может быть электропорация. Однако к ее минусам можно отнести высокий уровень клеточной гибели и большое количество варьируемых параметров, требующих оптимизации. Таким образом, при проведении эксперимента на наиболее распространенных, «легкотрансфицируемых» клеточных моделях оптимально использовать именно липофекцию. В настоящее время на рынке доступны различные реагенты для липофекции, самыми распространенными из них являются Lipofectamine (Invitrogen) и

Metafectene (Biontex, Германия). В нашей работе используется последний.

Принцип липофекции следующий. Во время инкубации siРНК с липидами в растворе образуются липосомы, внутрь которых попадает siРНК. При смешивании получившегося раствора с клетками происходит присоединение липосом к клеточной мембране и их объединение, в результате чего siРНК оказывается внутри клетки, имея возможность взаимодействовать с мРНК в цитоплазме.

1. Оптимизация проведения липофекции с siРНК

Эффективность липофекции зависит от многих параметров, которые могут варьироваться в зависимости от используемой клеточной культуры. Поэтому перед проведением нокдауна необходимо определить оптимальные условия трансфекции для наиболее эффективной доставки siРНК в клетки. Липофекция siРНК может проводиться в различных форматах (в планшетах с 6, 12, 24 или 96 лунками; в чашках диаметром 6 или 10 см) в зависимости от целей эксперимента. В нашей лаборатории для проведения нокдауна наиболее часто используемым форматом работы является планшет на 96 лунок, поэтому далее будет приведен пример оптимизации проведения нокдауна именно для этого формата. Параметры проведения оптимизации трансфекции для других форматов приведены в официальном протоколе производителя Metafectene [42]. Вне зависимости от формата эксперимента в первую очередь необходимо оптимизировать следующие параметры.

1. Соотношение количества siРНК/липосомы (мкг/мкл): от 1 : 1 до 1 : 8.

2. Абсолютное количество трансфицируемых комплексов (siРНК + липосомы). Для 96-луночного планшета количество siРНК может варьироваться от 0,04 до 0,3 мкг, а количество липосом — от 0,2 до 4 мкл.

3. Количество клеток. Для получения оптимальных результатов трансфекцию необходимо проводить на стадии логарифмического роста клеток. Оптимальной конfluентностью для проведения трансфекции является 30–60 % [42]. При этом количество клеток зависит от типа и размера клеток. Для 96-луночного планшета количество клеток обычно варьируется от 5×10^3 до 60×10^3 .

Кроме того, на эффективность липофекции влияют и другие параметры: 1) состояние клеток на момент трансфекции (должны быть здоровыми, активно делящимися); 2) наличие сыворотки в среде (для большинства культур трансфекция проходит эффективно при наличии 10 % сыворотки); 3) время инкубации с трансфицирующим комплексом (обычно составляет 3–6 ч, но может увеличиваться и до 72 ч); 4) в некоторых случаях увеличить эффективность трансфекции позволяет обработка клеток трансфицирующим раствором в течение часа после рассаживания.

Оценку эффективности липофекции клеток проводят по siРНК, меченной флуоресцентным красителем FAM (siFlu). При этом варьируют вышеописанные параметры. Кроме того, необходимо проводить контрольные эксперименты с липосомами без siРНК, а также оставлять необработанные клетки. Это необходимо как для определения токсического эффекта трансфицирующих агентов, так и для оценки эффективности трансфекции. Саму оценку проводят через 24 ч после проведения трансфекции, и определяют ее как долю клеток, содержащих флуоресцентную метку, от общего количества клеток. Также оценивается и токсичность трансфицирующих реагентов как

изменение общего количества клеток после трансфекции относительно необработанного контроля

Ниже приведен расчет (табл. 3) для проведения эксперимента по оптимизации условий трансфекции для 96-луночного формата. Подробный протокол проведения трансфекции см. в подразделе 3 «Протокол проведения липофекции».

После проведения оптимизации условий трансфекции можно оценить, насколько они пригодны для выполнения нокдауна. Также эффективность трансфекции может дать примерное представление о том, какое изменение экспрессии гена-мишени можно будет обнаружить в дальнейшем с помощью ПЦР в режиме «реального времени» при различной эффективности нокдауна (рис. 2). Например, если эффективность трансфекции составила 75 % и исследователи предполагают, что эффективность нокдауна будет 40 %, то детектируемое значение $\Delta\Delta Ct$ для гена-мишени составит менее 0,5 цикла, что в реальности может быть сложно достоверно определить с помощью ПЦР в режиме «реального времени». Если же эффективность нокдауна будет равна 90 %, то $\Delta\Delta Ct$ может достигать 1,5 цикла, а это можно детектировать с помощью ПЦР в режиме «реального времени».

2. Постановка трансфекции с siРНК к исследуемому гену

После проведения оптимизации условий трансфекции можно приступать к постановке эксперимента с целевой siРНК. Данный эксперимент необходимо ставить в нескольких биологических повторностях (от 5 до 7) для последующей корректной статистической обработки данных. И очень важно, чтобы в него входили следующие трансфекции:

- с siРНК, меченной флуоресцентной меткой (siFlu), для оценки эффективности трансфекции;
- с неспецифической siРНК (sicontrol);
- с siРНК к исследуемому гену;
- без siРНК.

В нашей работе трансфицированные клетки инкубировали до 120 ч для оценки эффекта нокдауна на различные клеточные показатели.

3. Протокол проведения липофекции

Ниже представлен протокол для проведения трансфекции клеточной линии НЕК293 с использованием реагента Metafectene [42].

Необходимые реактивы:

1. полная ростовая среда для клеточной культуры (в зависимости от используемой клеточной культуры),
2. натрий-фосфатный буфер (PBS),
3. реагент Metafectene,
4. растворы siРНК.

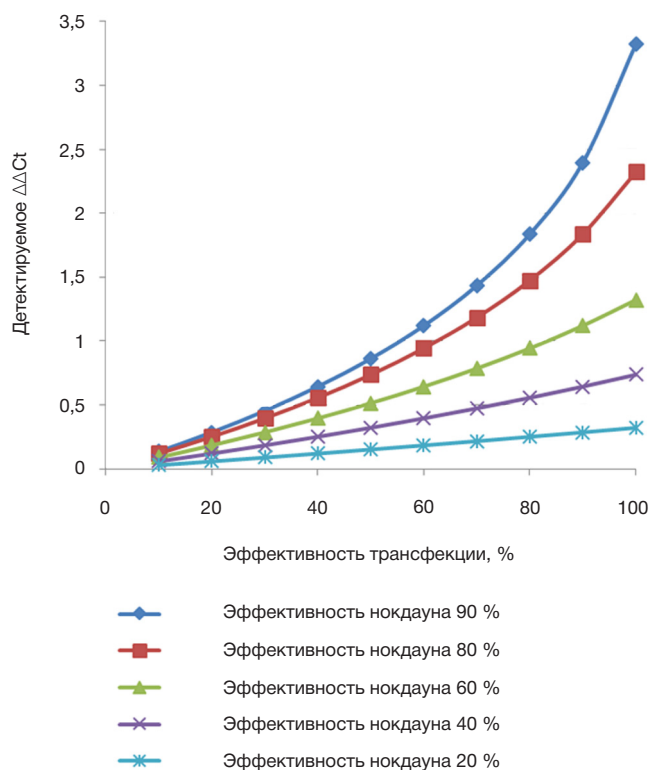


Рис. 2. График анализа значений детектируемых $\Delta\Delta Ct$ для разных эффективностей трансфекции при различной эффективности нокдауна

Таблица 3. Схема проведения эксперимента по оптимизации трансфекции в 96-луночном формате

		10×10 ³ клеток/луночка				20×10 ³ клеток/луночка			
FAM-siРНК/Met	siРНК	0,1 мкг (~15 пмоль)	0,1 мкг (~15 пмоль)	0,1 мкг (~15 пмоль)	0,1 мкг (~15 пмоль)	0,1 мкг (~15 пмоль)	0,1 мкг (~15 пмоль)	0,1 мкг (~15 пмоль)	0,1 мкг (~15 пмоль)
	Metafectene	0,1 мкл	0,2 мкл	0,4 мкл	0,8 мкл	0,1 мкл	0,2 мкл	0,4 мкл	0,8 мкл
	siРНК : Metafectene	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8
FAM-siРНК/Met	siРНК	0,2 мкг (~30 пмоль)	0,2 мкг (~30 пмоль)	0,2 мкг (~30 пмоль)	0,2 мкг (~30 пмоль)	0,2 мкг (~30 пмоль)	0,2 мкг (~30 пмоль)	0,2 мкг (~30 пмоль)	0,2 мкг (~30 пмоль)
	Metafectene	0,2 мкл	0,4 мкл	0,8 мкл	0,6 мкл	0,2 мкл	0,4 мкл	0,8 мкл	0,6 мкл
	siРНК : Metafectene	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8
FAM-siРНК/Met	siРНК	0,3 мкг (~45 пмоль)	0,3 мкг (~45 пмоль)	0,3 мкг (~45 пмоль)	0,3 мкг (~45 пмоль)	0,3 мкг (~45 пмоль)	0,3 мкг (~45 пмоль)	0,3 мкг (~45 пмоль)	0,3 мкг (~45 пмоль)
	Metafectene	0,3 мкл	0,6 мкл	1,2 мкл	2,4 мкл	0,3 мкл	0,6 мкл	1,2 мкл	2,4 мкл
	siРНК : Metafectene	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8
Без siРНК	siРНК	-	-	-	-	-	-	-	-
	Metafectene	0,3 мкл	0,6 мкл	1,2 мкл	2,4 мкл	0,3 мкл	0,6 мкл	1,2 мкл	2,4 мкл
siРНК : Metafectene	siРНК	-	-	-	-	-	-	-	-
	Metafectene	-	-	-	-	-	-	-	-
Необработанный	siРНК	-	-	-	-	-	-	-	-
	Metafectene	-	-	-	-	-	-	-	-
siРНК : Metafectene	siРНК	-	-	-	-	-	-	-	-
	Metafectene	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 4. Расчет количества siРНК и реагента Metafectene для разных видов планшетов на одну трансфекцию (протокол производителя Metafectene [42])

Размер планшета	6 лунок	24 лунки	96 лунок
Общий объем, мл	2,2	0,56	0,21
Объем суспензии клеток, мл	2,0	0,50	0,15
Раствор А (siРНК (30μМ) + буфер PBS, мкл) на 1 лунку	5,0 + 100,0	2,5 + 30,0	0,5 + 30,0
Раствор Б (липид + буфер PBS, мкл) на 1 лунку	5,0 + 100,0	2,5 + 30,0	0,4 + 30,0
Объем смеси растворов А и В (мкл) на 1 лунку	200,0	60,0	60
Количество клеток на 1 лунку ($\cdot 10^4$)	25	10	1

Необходимое оборудование:

- камера Горяева или проточный цитофлуориметр,
- ламинар для работы с эукариотами,
- CO₂-инкубатор.

Методика протокола для клеточной линии НЕК293 с siFlu представлена ниже.

1. Рассчитать количество реагентов, необходимых для трансфекции, исходя из планируемого числа реакций трансфекций (табл. 4).

2. Подготовить клетки для трансфекции: определить количество клеток в небольшой аликвоте, а далее довести клетки до необходимой концентрации в расчете на лунку планшета (например, для 96-луночного планшета на 25 лунок необходимо подготовить 4 мл суспензии с концентрацией клеток 67×10^3 клеток/мл и внести в каждую лунку по 150 мкл этой суспензии).

3. Подготовить реагенты: разморозить siРНК, подготовить метафектен и пробирки.

4. Для каждого типа образцов приготовить растворы А и Б, используя объемы, указанные в табл. 2. *Примечание.* Раствор А можно пипетировать интесивно, раствор Б — пипетировать один раз.

5. К раствору Б добавить раствор А и однократно пипетировать во избежание разрушения липосом. Инкубировать смесь 15 мин при комнатной температуре.

6. В это время посадить клетки в лунки планшета. Необходимо, кроме образцов с siРНК, подготовить лунки с образцами, куда будет добавлен только метафектен, и контрольные лунки с клетками, куда не будет добавлено никаких реагентов (необработанные клетки, контроль выживаемости вне зависимости от трансфекции).

7. По каплям добавить раствор А + Б в нужные лунки планшета. Помешать содержимое в лунках, покачивая планшет. Инкубировать 6 ч при 37 °С и содержании CO₂ 5 %.

8. Через 6 ч посмотреть на клетки под микроскопом. Если адгезионные клетки прикрепились к подложке, то аккуратно поменять среду из-за токсичности метафектена. Инкубировать 18 ч при 37 °С и содержании CO₂ 5 %.

9. Через 24 ч после трансфекции клетки из всех контрольных лунок промыть PBS, снять трипсином, затем инактивировать трипсин полной средой, открутить, ресуспендировать и посчитать на проточном цитометре для оценки эффективности липофекции и токсичности реактивов.

III. Оценка эффективности нокдауна

1. Выделение тотальной РНК из культур клеток

Следующим этапом проведения нокдауна является приготовление лизатов трансфицированных клеток и выделение из них РНК. Этот этап является очень важным при прове-

дении эксперимента, поскольку именно выделенная РНК будет служить основой для анализа ответа изучаемых генов. Существуют различные методы выделения РНК, основанные на разных принципах. Одним из первых появился метод выделения РНК в градиенте CsCl. Несмотря на то, что он позволяет получить очень качественный результат, сегодня его используют редко из-за трудоемкости и значительных затрат времени. Самый распространенный, простой и быстрый метод — это абсорбция на силикатных сорбентах. Для этого подхода выпускается множество различных наборов реагентов, но они довольно дороги и не всегда гарантируют хорошее качество выделения. Третий метод — выделение РНК фенол-хлороформной экстракцией. Этот метод является наиболее дешевым и качественным. На рынке доступен реагент TRIzol [43], позволяющий выделять РНК этим методом. Мы в своих экспериментах пользуемся классическим методом фенол-хлороформной экстракции [44, 45].

При выделении РНК существует достаточно большая вероятность ее контаминации РНКазам, которых много в окружающей среде. Поэтому выделение РНК должно происходить в чистой зоне, а используемые реагенты должны быть чистыми от РНКаз.

Для лизиса клеток используется гуанидин-тиоционатный буфер. Гуанидин тиоционат быстро проникает внутрь клеток и инактивирует РНКазы. Важно, чтоб перед лизисом трансфицированные клетки держали на холоде, а свежеприготовленные лизаты — во льду для предотвращения деградации РНК. После очистки образцов от дебриса лизаты следует поделить на две части, одну из которых можно хранить при -70 °С до полугода, а из другой части выделять РНК. Если в дальнейшем на каком-то этапе что-то не получится, можно взять материал из предыдущего шага, а не перерабатывать все сначала.

При фенол-хлороформной экстракции происходит разделение фенольной и водной фаз, при этом в верхней водной фазе остаются нуклеиновые кислоты, а белки частично уходят в фенольную фазу, частично — остаются в интерфазе. Чтобы разделить ДНК и РНК, применяют кислый фенол с рН 4,4, т. к. только в этом случае РНК стабильна, тогда как ДНК частично уходит в органическую фазу и интерфазу вместе с белками.

Необходимые реагенты:

- кислый фенол, насыщенный цитратным буфером (рН 4,4),
 - хлороформ,
 - этиловый спирт 96 % и 70 %,
 - гуанидин тиоционат буфер (ГТБ): 4 М гуанидин тиоционат, 25 мМ цитрат Na рН 7,0, 0,5 % N-лауроилсаркозин Na, 0,1 М β-меркаптоэтанол (добавлять перед использованием),
 - натрий-фосфатный буфер PBS,
 - вода, чистая от РНКаз.
- Необходимое оборудование:

1. генератор ультразвука,
2. центрифуга с охлаждением,
3. камера для электрофореза.

Ниже представлен полный протокол [44, 45] выделения РНК из культур клеток.

1. Достать пробирки, охладить их (на ледяной бане), подписать.

2. Адгезионные клетки в лунках отмыть от среды (насосом убрать среду, аккуратно залить холодным PBS, так же убрать PBS). Суспензионные клетки ресуспендировать в каждой лунке, далее центрифугировать на 1,5 кгpm 1 мин, отобрать среду, промыть раствором PBS.

3. Залить клетки 1 мл ГТБ, полученный лизат как можно быстрее перенести в охлажденные пробирки. Интенсивно провортексировать клетки.

4. Провести гомогенизацию клеток. *Примечание.* Гомогенизацию можно проводить пропуском лизата через стерильную иглу шприца, однако этот метод не является достаточно эффективным. Более качественным методом является ультразвуковая гомогенизация на холоде. Мы используем ультразвук мощностью 130 Вт в течение 30 с для гомогенизации [46].

5. После гомогенизации еще раз провортексировать образцы.

6. Центрифугировать лизаты на 10 000 g при 4 °С 5–20 мин для осаждения дебриса, который может мешать выделению РНК.

7. Супернатант перенести в чистые пробирки (переносить следует аккуратно, т. к. осадок не закреплен на дне пробирки).

8. Для каждого образца объем лизата разделить на две равные части: одна — для непосредственно выделения, вторая — запасная (убирается на хранение при –70 °С).

9. К 500 мкл лизата добавить 1/10 объема (50 мкл), 2 М ацетата натрия рН 4,2. Мягко перемешать.

10. Далее к лизатам добавить равный объем (500 мкл) кислого фенола, мягко смешать, инкубировать 5 мин при комнатной температуре (для полного растворения нуклеобелковых комплексов).

11. Добавить 1/5 объема хлороформа (100 мкл), интенсивно провортексировать.

12. Центрифугировать 20 мин при 10 000 g.

13. Аккуратно отобрать верхнюю фазу в чистую пробирку, стараясь не задеть и не забрать интерфазное кольцо.

14. Дополнительно, при наличии большого белкового интерфазного кольца, повторить фенол-хлороформную экстракцию несколько раз, пока интерфазное кольцо совсем не исчезнет. *Примечание.* Объем верхней фазы уменьшается с каждым центрифугированием, поэтому к нему следует добавлять недостающее до 500 мкл количество ГТБ.

15. К верхней фазе добавить равный объем смеси кислого раствора фенол : хлороформ (1 : 1, заранее смешать, т. к. при смешивании выделяется вода и объем меняется, 500 мкл). Интенсивно вортексировать, центрифугировать 10 мин при 10 000 g.

16. Аккуратно отобрать верхнюю фазу в чистую пробирку.

17. К верхней фазе добавить один объем хлороформа (500 мкл), интенсивно вортексировать, центрифугировать 10 мин при 10 000 g. Аккуратно отобрать верхнюю фазу в чистую пробирку.

18. К верхней фазе добавить 2,5 объема 96 % этилового спирта (1 250 мкл). Также для лучшей визуализации

осадка после центрифугирования можно добавить соосаждители (например, гликоген).

19. Инкубировать при –20 °С не менее 1 ч, затем можно оставить на ночь при –20 °С (осаждение нуклеиновых кислот).

20. Центрифугировать 20 мин при 10 000 g при +4 °С.

21. Супернатант слить, осадок промыть холодным 70 % этиловым спиртом. Постараться, чтобы спирт протек по стенке пробирки со всех сторон для очистки от солей, которые могут ингибировать ферментативные реакции. Центрифугировать 10 мин при 10 000 g при +4 °С.

22. Осадок подсушить на воздухе под ламинаром (оставить открытые пробирки на несколько минут, пока не испарятся последние капли и осадок, если он виден, не станет прозрачным), растворить в воде, не содержащей нуклеаз.

23. Проверить качество выделения РНК с помощью электрофореза. Если осадок был достаточно хорошо виден, то лучше наносить на электрофорез один образец дважды в разных количествах, например 1 и 5 мкл.

24. После электрофореза в 1 % агарозном геле цельная РНК должна выглядеть на геле как две мажорные полосы, соответствующие 18S и 28S рРНК, причем 28S бенд должен быть интенсивнее 18S примерно в 2 раза (рис. 3). На протяжении всей дорожки, от самого верха до самого низа, должен быть виден слабый шмер — это и есть высокомолекулярная мРНК. Важно, чтобы внизу геля не было бенда, который свидетельствует о деградации РНК. Если внизу присутствует бенд сильной интенсивности, то лучше выделить РНК заново, еще раз уделив внимание всем выше перечисленным шагам. Другой важной особенностью хорошего выделения является отсутствие геномной ДНК, которая «бежит» чуть выше полосы ДНК-маркера, соответствующей длине 10 тыс. п. н. При ее наличии также лучше выделить РНК заново, обращая внимание на буферизацию фенола и аккуратный отбор водной фазы.

Качество и количество полученной РНК можно оценить инструментально на спектрофотометре. Количество РНК определяется значением поглощения при 260 нм. Дополнительные измерения при 240 и 280 нм дадут исследователю представление о чистоте образца от белков. Она определяется подсчетом отношения значений поглощений 260/280, которое может колебаться от 0,5 до 2,0. Чем чище РНК от белков, тем ближе показатель к 2,0. Отношение значений

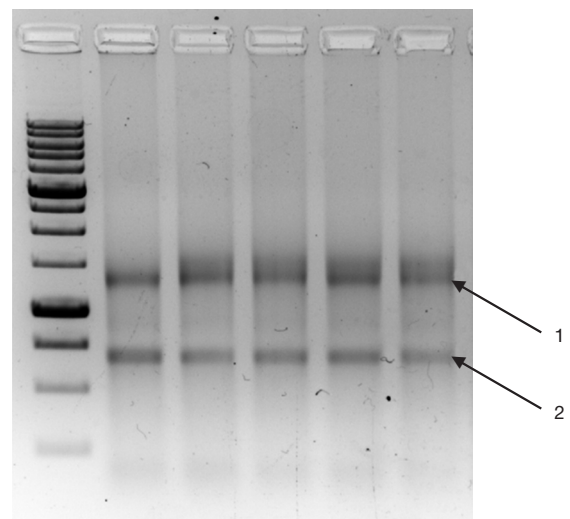


Рис. 3. Пример электрофореза качественно выделенных из лизата РНК. 1 — полоса, соответствующая 28S рРНК, 2 — полоса, соответствующая 18S рРНК

260/230 показывает чистоту РНК от органических примесей, в частности, от фенола, его солей и других солей, используемых при выделении РНК. В идеальном случае это значение также должно быть около 2,0. Если все же при выделении образец РНК оказался недостаточно чистым, его можно попробовать очистить дополнительным осаждением РНК спиртом.

Выделенную РНК необходимо хранить при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ и перед использованием размораживать на ледяной бане.

2. Обработка образцов РНК ДНКазой I

Контаминация ДНК в образцах РНК часто приводит к различным проблемам на этапе проведения ПЦР в режиме «реального времени»: образованию неспецифичных продуктов. Также необходимо подбирать разноэзонные праймеры для амплификации целевых генов, дабы избежать вклада геномной ДНК в результат реакции при амплификации кДНК. Поэтому оптимально использование РНК без примесей геномной ДНК. Практика показывает, что даже коммерческие наборы реагентов для выделения РНК не гарантируют получения РНК, свободной от ДНК. Для очистки РНК от нее образцы обрабатываются ДНКазой I.

Важно отметить, что на данном этапе мы советуем не обрабатывать ДНКазой I весь образец РНК, а работать с его частью. Таким образом, в случае ошибок или непредвиденных обстоятельств всегда можно вернуться на шаг назад.

Проведение реакции с ДНКазой I — несложная операция [47]: к аликвоте РНК необходимо добавить реакционный буфер и непосредственно фермент того же производителя. ДНКазу I нельзя вортиксировать, иначе она теряет свою активность. Инкубация с ферментом длится минимум 1 ч. Этого времени в большинстве случаев достаточно, чтобы хорошо очистить РНК от ДНК. Инактивация ДНКазы I происходит посредством добавления в смесь ЭДТА для хелатирования ионов Mg^{2+} и нагревания смеси до $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Необходимые реагенты:

1. буфер для работы ДНКазы I с Mg^{2+} ,
2. ЭДТА 50 мМ,
3. вода, чистая от РНКаз.

Необходимое оборудование: термостат.

Нами используется следующий протокол.

1. РНК разморозить на ледяной бане.
2. Отбрать аликвоту РНК (2–3 мкг) и довести ее объем до 8 мкл водой, чистой от РНКаз.
3. Добавить 1 мкл 10х реакционного буфера для ДНКазы I, провортиксировать.
4. Добавить 1 мкл фермента, сбросить капли вниз (не вортиксировать).
5. Инкубировать 1 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
6. Добавить 1 мкл 50 мМ ЭДТА и инкубировать 10 мин при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. Контроль очистки образцов РНК от примесей ДНК

Для проверки успешности работы ДНКазы необходимо оценить оставшееся количество ДНК в образце. Для этого проводится реакция ПЦР в режиме «реального времени» с парой праймеров, отжигающихся на геномной ДНК. В качестве контрольного образца в реакцию также нужно взять образец РНК до обработки ДНКазой I и геномную ДНК. Получаемое значение C_t с образца, обработанного

ферментом, должно быть больше значений C_t , полученных с образцов РНК до обработки ДНКазой I и геномной ДНК. Если значение C_t больше 37 циклов, то можно считать обработку успешной. При таком значении геномная ДНК не будет вносить значимого вклада в экспрессионный анализ.

Необходимые реагенты:

1. вода, чистая от РНКаз,
2. ПЦР-смесь (5х): рабочий буфер для полимеразы (5х), MgCl_2 (12,5 мМ), смесь 4 дезоксирибонуклеотидов (1 мМ каждого).

3. Taq-полимераза,

4. краситель EvaGreen,

5. для ПЦР-участка гена HPRT1 использовали следующие праймеры:

HPRT f3 — ACCACCGTGTGTTAGAAAAGTA,

HPRT r3 — AGGGAAGCTGCTGACAAAGATT.

Необходимое оборудование:

1. амплификатор для проведения ПЦР в режиме «реального времени»,

2. камера для электрофореза.

Для постановки контрольной ПЦР мы используем праймеры к гену *HPRT1*, амплифицирующие фрагмент геномной ДНК, по следующему протоколу:

1. На каждый образец готовится ПЦР-смесь:

- ПЦР-буфер (5х) — 4 мкл,
- праймеры (2,5 μM) — 2 мкл каждого,
- EvaGreen (20х) — 1 мкл,
- Taq-полимераза (5 ед./мкл) — 0,25 мкл,
- вода — 9,75 мкл,
- матрица — 1 мкл,

2. Амплификация проходит по следующему температурному профилю: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 1 мин; 40 циклов: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 10 с, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 10 с, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ — 10 с; флуоресценция снимается одновременно с элонгацией; кривая плавления — с 60 до $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ с шагом в $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. Анализ полученных кривых амплификаций, полученные значения C_t .

Также важно отметить, что после обработки образцов РНК ДНКазой I необходимо проконтролировать качество РНК с помощью электрофореза, как было описано выше.

4. Получение кДНК с помощью реакции обратной транскрипции

Данный этап также является несложным по исполнению, однако он очень важен для последующего анализа, поскольку при неэффективном прохождении обратной транскрипции при экспрессионном анализе могут быть получены данные, не соответствующие реальному ответу клеток на воздействие.

На сегодняшний день существует два основных способа получения кДНК — с помощью случайных гексануклеотидов и с помощью так называемого oligo-dT-праймера. Случайные гексануклеотиды могут отжигаться в любых местах на молекулах РНК, поэтому в результате получается библиотека фрагментов кДНК, соответствующих всем последовательностям РНК. Oligo-dT-праймер отжигается на поли-А-хвост мРНК, поэтому в результате получается библиотека полиаденилированных РНК. Выбор праймеров для обратной транскрипции (ОТ) зависит от природы изучаемого гена и имеющихся праймеров для его амплификации. Использование случайных гексануклеотидов позволяет получить кДНК, в которой представлены все участки РНК, что позволит использовать праймеры, подобранные

на любую часть транскрипта. Хотя 5'-концы у таких библиотек представлены большим числом фрагментов синтетизированных кДНК. И напротив, oligo-dT-праймер позволяет более эффективно получать фрагменты кДНК, соответствующие 3'-концам РНК [48]. Кроме того, библиотека будет обогащена полиаденилированными мРНК. Поэтому в зависимости от длины мРНК гена и того места, куда подобраны праймеры для дальнейшей амплификации, экспериментатор сам выбирает подходящий для него вариант.

Протокол обратной транскрипции включает 3 этапа: двух- или трехстадийный отжиг праймеров на РНК, саму реакцию обратной транскрипции и ее инактивацию.

Необходимые реагенты:

1. обратная транскриптаза,
2. буфер для работы обратной транскриптазы,
3. дезоксинуклеотидтрифосфаты (dNTPs),
4. $MgCl_2$ 25 mM,
5. вода, чистая от нуклеаз.

Необходимое оборудование: термостат и ледяная баня.

Протокол реакции обратной транскрипции по [49] представлен ниже.

1. Перед началом работы подготовить термостат на 70 °С, ледяную баню.

2. Рассчитать компоненты реакционной смеси, исходя из концентрации РНК (табл. 5). Конечный объем реакции должен быть равен 10–30 мкл. Если получилось так, что РНК — низкой концентрации и объем смеси больше, то лучше в разумных пределах снизить количество РНК на реакцию, но не увеличивать объем реакции.

3. К объему, содержащему 1 мкг РНК, добавить 10 пмоль праймера oligodT (5'-(T)₂₅VN-3') или 100 пмоль рандомных гексануклеотидов.

4. Инкубировать 3 мин при 70 °С.

5. Быстро перенести в ледяную баню на 3 мин.

6. Приготовить и добавить к РНК реакционную смесь.

7. Инкубировать 2 мин при 42 °С (не обязательный шаг).

8. Добавить 1 мкл ImProm-II Reverse Transcriptase (200 ед.).

9. Инкубировать 15 мин при 20 °С (шаг только для случайных гексануклеотидов).

10. Инкубировать 1,5 ч при 42 °С (работа обратной транскриптазы).

11. Инактивировать ревертазу: 70 °С, 20 мин.

12. Разбавить кДНК в 10–20 раз водой для ПЦР.

5. Контроль качества полученной кДНК

Несмотря на то, что реакция обратной транскрипции достаточно простая, порой кДНК может не получаться, при том, что все характеристики использованной в реакции РНК могут быть хорошими. Это может происходить из-за следующих распространенных ошибок: недостаточной от-

чистки РНК при фенольной экстракции; плохой промывки осадка РНК после высаживания от солей; недосушивания осадка РНК после высаживания и растворения ее со следами спирта. Именно по этим причинам очень важно после ОТ проверять качество полученной кДНК с помощью ПЦР в режиме «реального времени».

Для этого на полученной кДНК ставится пробная ПЦР в режиме «реального времени» на праймерах к гену «домашнего хозяйства», например *B2M* или *HPRT1*. Но при этом необходимо ставить реакции с отрицательным и положительным контролями — с водой и контрольной кДНК соответственно. В результате такой пробной амплификации по полученным значениям *Ct* можно оценить успешность прохождения обратной транскрипции на исследуемых образцах РНК. В идеальном случае значения *Ct* для всех образцов должны находиться в пределах одного цикла. Если значение *Ct* опытного образца отличается от остальных более чем на 4 цикла, то такая кДНК непригодна для дальнейшего анализа. В каких-то случаях необходимо провести дополнительную очистку РНК путем повторного осаждения ее спиртом.

Необходимые реагенты:

1. вода, чистая от РНКаз,
2. ПЦР-смесь (5x): рабочий буфер для полимеразы (5x), $MgCl_2$ (12,5 mM), смесь 4 дезоксинуклеотидов (1 mM каждого).

3. Taq-полимераза,

4. краситель EvaGreen (или SybrGreen),

5. для ПЦР участка гена *HPRT1* использовали следующие праймеры:

HPRT f4 — TCAGGCAGTATAATCCAAAGATGGT,

HPRT r4 — AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG.

Необходимое оборудование: амплификатор для проведения ПЦР в режиме «реального времени».

Для постановки пробной ПЦР мы используем праймеры к генам «домашнего хозяйства», например *B2M* и *HPRT1*.

Протокол оценки качества полученной кДНК с использование гена *HPRT1* — ниже.

1. На каждый образец кДНК готовится следующая ПЦР-смесь:

- ПЦР-смесь (5x) — 4 мкл,
- праймеры (2,5 μM) — 2 мкл каждого,
- EvaGreen (20x) — 1 мкл,
- Taq-полимераза (5 ед./мкл) — 0,25 мкл,
- вода — 0,75 мкл,
- матрица — 10 мкл.

2. Амплификация проходит по следующему температурному профилю: 95 °С — 1 минута; 40 циклов: 95 °С — 10 с, 60 °С — 10 с; 72 °С — 10 с (снятие флуоресценции происходило на шаге элонгации); кривая плавления с 60 до 95 °С с шагом в 0,3 °С.

Таблица 5. Расчет смеси для постановки реакции обратной транскрипции

Компонент	Концентрация стокового раствора	Объем на 1 реакцию (20 мкл)
РНК	–	0,5–1,0 мкг
Праймер	10 μM (oligodT)	1 мкл
	100 μM (случайные гексанулеотиды)	1 мкл
ImProm-II™ Reaction Buffer	5x	4 мкл
Смесь dNTPs	2mM (каждого)	2 мкл
$MgCl_2$	25mM	2 мкл
ImProm-II Reverse Transcriptase	200 ед./мкл	1 мкл
Вода, не содержащая нуклеаз (MQ)	–	До 20 мкл

3. Анализ полученных кривых амплификаций, получение значений C_t .

4. Для гена *HPRT1* значения C_t должны соответствовать контрольной кДНК (как правило, около 25 циклов). Если полученные значения C_t для исследуемых кДНК примерно совпадают с контрольными, значит, эту кДНК можно использовать в дальнейших экспериментах.

б. Оценка эффективности нокдауна с помощью ПЦР в режиме «реального времени»

Известно, что эффективность полимеразной цепной реакции зависит от различных факторов, в том числе и концентрации матрицы. Поэтому перед тем как измерять изменение экспрессии генов, необходимо выровнять концентрацию кДНК-образцов. Выравнивание производится разбавлением кДНК водой согласно полученным значениям C_t с помощью ПЦР в режиме «реального времени». Необходимо, чтобы максимальная разница между образцами кДНК была не больше одного цикла. Тогда получаемый разброс данных при конечном подсчете будет минимальным.

После выравнивания количества кДНК можно приступить к непосредственному анализу экспрессии генов с помощью ПЦР в режиме «реального времени». Экспрессия генов-мишеней оценивается относительно генов домашнего хозяйства. Согласно рекомендациям The MIQE Guidelines [50], для нормализации экспрессионных данных необходимо использовать несколько референсных генов — три или более. Чем больше их будет взято в эксперимент, тем качественнее и объективнее будет проведена оценка изменения экспрессии целевых генов. Важно отметить, что референсные гены имеют различные уровни экспрессии, поэтому брать в эксперимент слабо- и высокоэкспрессирующиеся референсные гены было бы ошибкой. В наших исследованиях для нормализации экспрессионных данных мы используем следующие гены: *HPRT1*, *TFRC*, *B2M*, *TBP*.

ПЦР в режиме «реального времени» необходимо проводить в 3 или более технических повторностях для каждого образца кДНК. Сами реакции могут проходить как с участием интеркалирующего красителя, так и TaqMan-зондов. Безусловно, последние более удобны для работы, т. к. характеризуются высокой специфичностью ПЦР. Однако стоимость зондов несравнимо выше, и, если не предполагается ставить большого количества экспериментов, интеркалирующие красители являются хорошей альтернативой [51].

При использовании любой системы ПЦР в режиме «реального времени» (как с интеркалирующими красителями, так и с TaqMan-зондами) необходимо предварительно подобрать оптимальные условия их работы для контрольных образцов кДНК, поскольку на этапе ПЦР в режиме «реального времени» возможны ошибки, сопряженные с неадекватной работой праймеров.

Необходимые реагенты:

1. вода, чистая от РНКаз,
2. ПЦР-смесь (5x): рабочий буфер для полимеразы (5x), $MgCl_2$ (12,5 mM), смесь 4 дезоксирибонуклеотидов (1 mM каждого).
5. Taq-полимераза,
6. краситель EvaGreen.

Необходимое оборудование: амплификатор для проведения ПЦР в режиме «реального времени».

Выше мы уже описывали расчеты реакционной смеси для ПЦР в режиме «реального времени». Для большинства амплифицируемых локусов мы используем следующий температурный профиль: 95 °C — 1 мин; 40 циклов: 95 °C — 10 с, 60 °C — 10 с, 72 °C — 10 с (снятие флуоресценции происходило на шаге элонгации); кривая плавления с 60 до 95 °C с шагом в 0,3 °C.

После окончания реакции ПЦР в режиме «реального времени» необходимо проанализировать полученные данные, первым делом — кривые плавления, чтобы убедиться, что амплификация прошла специфично и без образования праймеров-димеров. Далее необходимо сравнить технические повторности для каждого образца. Если повторности отличаются между собой более, чем на 0,3 цикла, то необходимо повторить реакцию ПЦР, тщательно соблюдая протокол. Для анализа данных берут средние C_t из технических повторностей.

После этого можно приступить к подсчету относительных уровней экспрессии исследуемых генов. Значения для референсных генов необходимо усреднить, вычислив для них среднее геометрическое [52]. Дальнейшие расчеты ведутся по методу $\Delta\Delta C_t$:

1. вычислить среднее геометрическое для генов «домашнего хозяйства» $C_t(ref)$,
2. вычислить $\Delta C_t = C_t(целевого\ гена) - C_t(ref)$,
3. вычислить среднее значение $\Delta C_t(med)$ и стандартное отклонение SD,
4. вычислить $\Delta\Delta C_t$ по формуле: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(целевого\ гена) - \Delta C_t(med)_{контрольная}$,
5. для получения относительного уровня экспрессии необходимо полученное значение подставить в формулу: $2^{-\Delta\Delta C_t}$,
6. для *si*control значение из п. 5 должно быть равно 1.

Полученное значение является отражением того, насколько изменился уровень экспрессии целевого гена в образцах, обработанных целевой *si*РНК, относительно контрольных образцов, обработанных неспецифической *si*РНК. Далее необходимо вычислить границы погрешности и оценить статистическую достоверность полученных изменений. Значения доверительного интервала вычисляются по формуле $2^{-(\Delta\Delta C_t \pm SD)}$, где $\Delta\Delta C_t$ — это значение, полученное в п. 4 для изучаемого гена в образцах с таргетной *si*РНК по отношению к контрольным образцам, SD — стандартное отклонение значения ΔC_t между биологическими повторностями для таргетной *si*РНК. Соответственно, значения ошибок будут вычисляться как разница между максимальным или минимальным значением доверительного

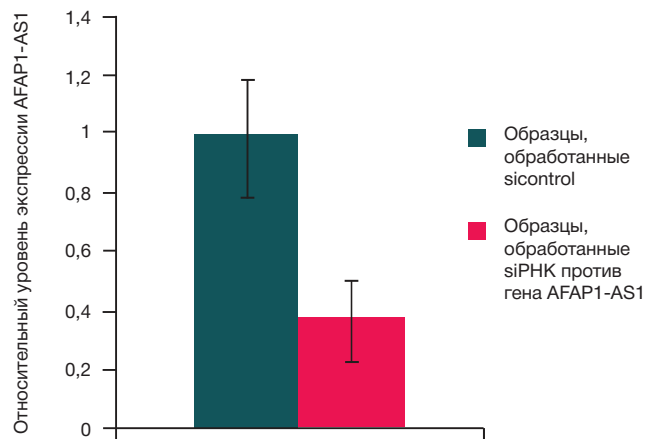


Рис. 4. Пример гистограммы, составляемой по итогам анализа результатов ПЦР в режиме «реального времени»

интервала и полученным $\Delta\Delta Ct$. По итогам вычислений строят гистограммы, на которых откладывают полученные значения ошибок (рис. 4).

Для оценки статистической значимости полученных данных чаще всего используются непараметрические критерии Колмогорова–Смирнова и Манна–Уитни.

IV. Анализ эффекта нокдауна на клеточной культуре

В зависимости от цели эксперимента после проведения нокдауна целевого гена можно проводить измерения различных показателей как на молекулярно-биологическом (влияние на экспрессию других генов), так и на клеточном уровне. Влияние нокдауна конкретного гена на жизнедеятельность клеток может быть проанализировано при помощи различных клеточных тестов, оценивающих уровень пролиферации, апоптоза, миграции клеток, построения кривых роста, анализа клеточного цикла.

Одним из самых распространенных параметров жизнедеятельности клетки, измеряемый во многих подобных исследованиях, является анализ жизнеспособности (cell viability assay). Он позволяет оценить количество живых клеток исследуемом образце и тем самым определить скорость пролиферации или выживаемость клеток после какого-либо воздействия на них. Существует несколько разных подходов для исследования жизнеспособности клеток: использование различных тетразолиевых красителей (MTT, MTS, XTT, WST-1), резазурина, протеазных маркеров жизнеспособности (GF-AFC), измерение уровня АТФ и др. Все эти методы имеют свои преимущества и недостатки. Но все же на сегодняшний день самым распространенным методом исследования клеточной жизнеспособности является метод, основанный на восстановлении тетразолиевых красителя МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Данный метод является наиболее дешевым и простым, хотя по чувствительности уступает некоторым другим методикам, поэтому его часто используют для первичного скрининга [53].

Принцип метода основан на том, что живые клетки способны восстанавливать МТТ до формазана (окрашенного нерастворимого в воде вещества с максимальным значением поглощения при 570 нм), количество которого в конечном счете и регистрируется в эксперименте. МТТ является коммерчески доступным реагентом, в нашей работе используется МТТ, поставляемый фирмой «ПанЭко» (Россия) в виде сухого вещества.

Если целью эксперимента является определение влияния нокдауна гена на жизнеспособность клеток, то обычно ее измеряют в образцах, обработанных контрольной siРНК и целевой siРНК. Каждый образец в отдельном эксперименте измеряется минимум в 5 биологических повторностях. Кроме того, измерение жизнеспособности необходимо в течение некоторого времени, через различные временные промежутки, например один раз в сутки в течение 5 дней (временные точки могут варьировать в зависимости от цели эксперимента). Таким образом, каждый эксперимент, начиная с трансфекции, должен быть продублирован такое количество раз, которое соответствует количеству временных точек, т. к. в процессе МТТ-теста исследуемые клетки погибают.

Ниже описано проведение МТТ-теста (по [53, 54] с изменениями).

Необходимые реактивы:

1. рабочий раствор МТТ в натрий-фосфатном буфере (PBS) pH 7,4 с концентрацией 5 мг/мл. Раствор необхо-

димо простерилизовать через фильтр с порами 0,2 мкм. Хранить раствор МТТ необходимо в защищенном от света месте в замороженном состоянии — до 6 мес., при +4 °C — не более 2 нед.,

2. растворитель DMSO (диметилсульфоксид), 100 %.

Необходимое оборудование:

1. планшетный ридер, способный измерять оптическую плотность при длинах волн 570 и 670 нм,

2. качалка для плашек (опционально).

Протокол проведения теста:

1. Для проведения МТТ-теста трансфекцию проводят в плоскостном 96-луночном планшете.

2. После смены среды объем свежезаливаемой полной среды должен составлять 150 мкл/луночка. *Примечание.* Кроме того, необходимо подготовить контрольные луночки без клеток, но со средой (далее — пустые луночки), в количестве, равном количеству биологических повторов в эксперименте, и проводить с ними все дальнейшие манипуляции в точности, как с образцами.

3. В каждую луночку с исследуемой культурой добавить 20 мкл рабочего раствора МТТ (5 мг/мл). Мягко пипетировать.

4. Инкубировать 3–4 ч при 37 °C и 5 % CO₂.

5. Удалить среду и слегка подсушить ячейки.

6. Растворить образованный формазан в 200 мкл DMSO. Желательно использовать качалку для плашек в течение 10 мин при комнатной температуре для быстрого и равномерного растворения продукта.

7. С помощью плашечного ридера измерить оптическую плотность растворов в каждой исследуемой луночке при 570 нм и фоновые значения — при 670 нм.

Анализ полученных результатов

1. Для каждой луночки необходимо определить исправленную оптическую плотность ($D_{испр}$), вычисляемую как $D(570\text{ нм}) - D(670\text{ нм})$, где D — оптическая плотность.

2. Далее для каждой луночки с клетками: из $D_{испр}$ необходимо вычесть среднее $D_{испр}$ пустых лунок.

3. Полученные значения оптической плотности необходимо усреднить по каждому образцу и определить стандартное отклонение для каждого значения.

4. Построить график зависимости полученных значений от времени после трансфекции для различных образцов (рис. 5).

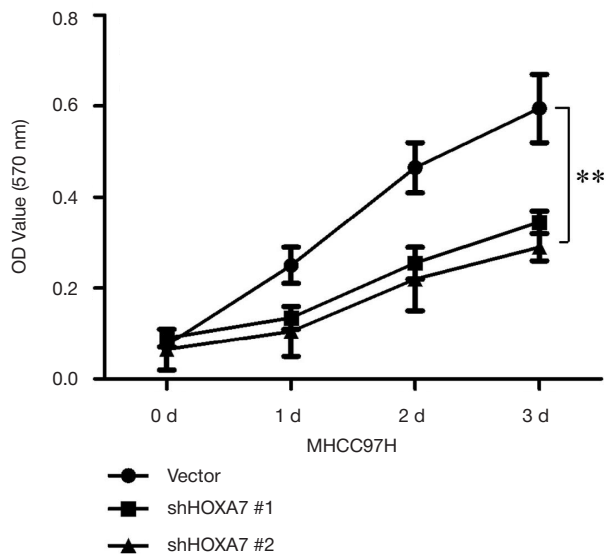


Рис. 5. Пример результатов МТТ-теста при нокдауне гена *HOXA7* (Tang и соавт. [55])

ВЫВОДЫ

Проведение нокдауна с помощью siРНК — это сложная и многостадийная процедура. На каждом этапе проведения есть свои подводные камни, о которых надо знать и учи-

тывать их, чтобы получить качественный результат. Непонимание или несоблюдение всех правил может привести к ошибкам на разных стадиях эксперимента и получению не соответствующих действительности результатов или их неправильной интерпретации.

Литература

- Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, Tapanari E, Diekhans M, Kokocinski E et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* 2012 Sep; 22 (9): 1760–74. DOI: 10.1101/gr.135350.111.
- Hacisuleyman E, Goff LA, Trapnell C, Williams A, Henao-Mejia J, Sun L et al. Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre. *Nat Struct Mol Biol.* 2014 Feb; 21 (2): 198–206. DOI: 10.1038/nsmb.2764.
- Mondal T, Subhash S, Vaid R, Enroth S, Uday S, Reinius B et al. MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF-beta pathway genes through formation of RNA-DNA triplex structures. *Nat Commun.* 2015 Jul 24; 6: 7743. DOI: 10.1038/ncomms8743.
- Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG et al. Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet.* 2003 Jun; 34 (2): 157–65. DOI: 10.1038/ng1157.
- Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell.* 2010 Jun 11; 38 (5): 662–74. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.03.021.
- Prelich G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics.* 2012 Mar; 190 (3): 841–54. DOI: 10.1534/genetics.111.136911.
- Skoblov MYu. Prospects of technologies of antisense therapy. *Mol Biol (Mosk).* 2009; 43 (6): 917–29.
- Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Jan; 75 (1): 280–4.
- Марахонов А. В., Баранова А. В., Скоблов М. Ю. РНК-интерференция: фундаментальные и прикладные аспекты. *Медицинская генетика.* 2008; 7 (10): 44–56.
- Glebova K, Reznik ON, Reznik AO, Mehta R, Galkin A, Baranova A et al. Technology in Kidney Transplantation: Current Status and Future Potential. *BioDrugs.* 2014 Aug; 28 (4): 345–61. DOI: 10.1007/s40259-014-0087-0.
- Glebova KV, Marakhonov AV, Baranova AV, Skoblov M. Therapeutic siRNAs and nonviral systems for their delivery. *Mol Biol (Mosk).* 2012 May–Jun; 46 (3): 371–86.
- Филатова А. Ю., Скоблов М. Ю. Использование siРНК в терапии кардиоваскулярных заболеваний. *Клиническая и экспериментальная хирургия.* 2014; (4): 12–9.
- Вяхирева Ю. В., Зернов Н. В., Марахонов А. В., Гуськова А. А., Скоблов М. Ю. Современные подходы к лечению миодистрофий. *Медицинская генетика.* 2016; 15 (10): 3–16.
- Ramachandran PV, Ignacimuthu S. RNA interference--a silent but an efficient therapeutic tool. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013 Mar; 169 (6): 774–89. DOI: 10.1007/s12010-013-0098-1.
- O'Keefe EP. siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing. *Mater Methods.* 2013; 3: 197. DOI: 10.13070/mm.en.3.197.
- Chaudhary A, Srivastava S, Garg S. Development of a software tool and criteria evaluation for efficient design of small interfering RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jan 7; 404 (1): 313–20. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.114.
- Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Jan; 9 (1): 57–67. DOI: 10.1038/nrd3010.
- Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science.* 2002 May 17; 296 (5571): 1270–3. DOI: 10.1126/science.1069132.
- Applied Biosystems Inc. Reduced siRNA Concentrations Lead to Fewer Off-Target Effects. *TechNotes.* 2008; 15 (2): 13–5.
- Zhang J, Wu Q, Wang Z, Zhang Y, Zhang G, Fu J et al. Knockdown of PSF1 expression inhibits cell proliferation in lung cancer cells in vitro. *Tumour Biol.* 2014 Nov 15; 36 (3): 2163–8. DOI: 10.1007/s13277-014-2826-8.
- Yu D, Makkar G, Dong T, Strickland DK, Sarkar R, Monahan TS. MARCKS Signaling Differentially Regulates Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cell Proliferation through a KIS-, p27kip1-Dependent Mechanism. *PLoS One.* 2015; 10 (11): e0141397. DOI: 10.1371/journal.pone.0141397.
- Huang XH, Jian WH, Wu ZF, Zhao J, Wang H, Li W et al. Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of macrophage migration inhibitory factor (MIF) suppressed cyclin D1 expression and hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Oncotarget.* 2014 Jul; 5 (14): 5570–80. DOI: 10.18632/oncotarget.2141.
- Takasaki S. Selecting effective siRNA target sequences by using Bayes' theorem. *Comput Biol Chem.* 2009 Oct; 33 (5): 368–72. DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2009.07.009.
- Gorodkin J, Ruzzo WL, editors. *RNA Sequence, Structure, and Function: Computational and Bioinformatic Methods.* Vol. 1097. New York: Springer Science+Business Media; 2014. DOI: 10.1007/978-1-62703-709-9_1.
- Takasaki S. Methods for selecting effective siRNA target sequences using a variety of statistical and analytical techniques. *Methods Mol Biol.* 2013; 942: 17–55.
- Lagana A, Veneziano D, Russo F, Pulvirenti A, Giugno R, Croce MC et al. Computational design of artificial RNA molecules for gene regulation. *Methods Mol Biol.* 2015; 1269: 393–412.
- Cui W, Ning J, Nail UP, Duncan MK. OptiRNAi, an RNAi design tool. *Comput Methods Programs Biomed.* 2004 Jul; 75 (1): 67–73. DOI: 10.1016/j.cmpb.2003.09.002.
- Naito Y, Yoshimura J, Morisita S, Ui-Tei K. siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics.* 2009 Nov 30; 10: 392. DOI: 10.1186/1471-2105-10-392.
- Matveeva O, Nechipurenko Y, Rossi L, Moore B, Saetrom P, Ogurtsov AY et al. Comparison of approaches for rational siRNA design leading to a new efficient and transparent method. *Nucleic Acids Res.* 2007 Apr 10; 35 (8): e63. DOI: 10.1093/nar/gkm088.
- Katoh T, Suzuki T. Specific residues at every third position of siRNA shape its efficient RNAi activity. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan 26; 35 (4): e27. DOI: 10.1093/nar/gkl1120.
- Jiang P, Wu H, Da Y, Sang F, Wei J, Sun X et al. RFRCD-B-siRNA: improved design of siRNAs by random forest regression model coupled with database searching. *Comput Methods Programs Biomed.* 2007 Sep; 87 (3): 230–8. DOI: 10.1016/j.cmpb.2007.06.001.
- Lu ZJ, Mathews DH. OligoWalk: an online siRNA design tool utilizing hybridization thermodynamics. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jul 1; 36 (Web Server issue): W104–8. DOI: 10.1093/nar/gkn250.
- Ding Y, Chan CY, Lawrence CE. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 1; 32 (Web Server issue): W135–41. DOI: 10.1093/nar/gkh449.
- Vert JP, Foveau N, Lajaunie C, Vandenbrouck Y. An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics.* 2006 Nov 30; 7: 520. DOI: 10.1186/1471-2105-7-520.
- Xu P, Zhang Y, Kang L, Roossinck MJ, Mysore KS. Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiol.* 2006 Oct; 142 (2): 429–40. DOI: 10.1104/pp.106.083295.

36. Tafer H, Ameres SL, Obernosterer G, Gebeshuber CA, Schroeder R, Martinez J et al. The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs. *Nat Biotechnol.* 2008 May; 26 (5): 578–83. DOI: 10.1038/nbt1404.
37. Ichihara M, Murakumo Y, Masuda A, Matsuura T, Asai N, Jijiwa M et al. Thermodynamic instability of siRNA duplex is a prerequisite for dependable prediction of siRNA activities. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35 (18): e123. DOI: 10.1093/nar/gkm699.
38. Eurofins Genomics. siMAX siRNA - The RNA Interfering Molecule, siRNA Controls, Non Specific Control 47% GC [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/custom-rna-oligos/simax-sirna.aspx>
39. Zirzow AC, Skoblov M, Patanarut A, Smith C, Fisher A, Chandhoke V et al. Nanoscale «DNA baskets» for the Delivery of siRNA. In: Herold KE, Vossoughi J, Bentley WE, editors. *IFMBE Proceedings: 26th Southern Biomedical Engineering Conference SBEC 2010; 2010 Apr 30–May 2; College Park, Maryland, USA.* Berlin. Heidelberg: Springer; 2010. p. 130–3.
40. Glebova KV, Marakhonov AV, Baranova AV, Skoblov MYu. Nonviral delivery systems for small interfering RNAs. *Mol Biol (Mosk).* 2012; 46 (3): 349–61.
41. Марахонов А. В., Сержанова В. А., Скоблов М. Ю., Баранова А. В. Разработка системы тестирования средств доставки мРНК. *Медицинская генетика.* 2010; 9 (12): 12–5.
42. Biontix Laboratories. Metafectene Manual [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: http://www.n-genetics.com/file/Manual_METAFACTENE_en.pdf
43. Invitrogen. TRIzol™ Reagent User Guide [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf
44. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr; 162 (1): 156–9.
45. Green MR, Sambrook J, editors. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 4th ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
46. Diagenode. Bioruptor User Manual [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: http://ipmb.sinica.edu.tw/microarray/index.files/Bioruptor_Manual.pdf
47. Thermo Fischer Scientific Inc. DNase I RNase free User Guide [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012000_DNase_I_RNasefree_1UuL_UG.pdf
48. Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem.* 2004 Mar; 50 (3): 509–15. DOI: 10.1373/clinchem.2003.026161.
49. Promega. Improm II Reverse Transcription System Protocol [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/improm-ii-reverse-transcription-system-protocol.pdf>
50. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr; 55 (4): 611–22. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.
51. Gurvich OL, Skoblov M. Real-time PCR and multiplex approaches. *Methods Mol Biol.* 2011; 784: 1–13. DOI: 10.1007/978-1-61779-289-2_1.
52. LifeTechnologies. Real-time PCR handbook [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
53. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ et al. *Cell Viability Assays.* In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K et al., editors. *Assay Guidance Manual.* Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
54. Promega. Technical Bulletin CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-non-radioactive-cell-proliferation-assay-protocol.pdf>
55. Tang B, Qi G, Sun X, Tang F, Yuan S, Wang Z et al. HOXA7 plays a critical role in metastasis of liver cancer associated with activation of Snail. *Mol Cancer.* 2016 Sep 6; 15 (1): 57. DOI: 10.1186/s12943-016-0540-4.

References

1. Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, Tapanari E, Diekhans M, Kokocinski E et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* 2012 Sep; 22 (9): 1760–74. DOI: 10.1101/gr.135350.111.
2. Hacisuleyman E, Goff LA, Trapnell C, Williams A, Henao-Mejia J, Sun L et al. Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre. *Nat Struct Mol Biol.* 2014 Feb; 21 (2): 198–206. DOI: 10.1038/nsmb.2764.
3. Mondal T, Subhash S, Vaid R, Enroth S, Uday S, Reinius B et al. MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF-beta pathway genes through formation of RNA-DNA triplex structures. *Nat Commun.* 2015 Jul 24; 6: 7743. DOI: 10.1038/ncomms8743.
4. Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG et al. Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet.* 2003 Jun; 34 (2): 157–65. DOI: 10.1038/ng1157.
5. Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell.* 2010 Jun 11; 38 (5): 662–74. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.03.021.
6. Prelich G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics.* 2012 Mar; 190 (3): 841–54. DOI: 10.1534/genetics.111.136911.
7. Skoblov MYu. Prospects of technologies of antisense therapy. *Mol Biol (Mosk).* 2009; 43 (6): 917–29.
8. Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Jan; 75 (1): 280–4.
9. Marakhonov AV, Baranova AV, Skoblov MYu. [RNA interference: fundamentals and applications]. *Medical Genetics.* 2008; 7 (10): 44–56. Russian.
10. Glebova K, Reznik ON, Reznik AO, Mehta R, Galkin A, Baranova A et al. Technology in Kidney Transplantation: Current Status and Future Potential. *BioDrugs.* 2014 Aug; 28 (4): 345–61. DOI: 10.1077/s40259-014-0087-0.
11. Glebova KV, Marakhonov AV, Baranova AV, Skoblov MYu. Therapeutic siRNAs and nonviral systems for their delivery. *Mol Biol (Mosk).* 2012 May–Jun; 46 (3): 371–86.
12. Filatova AYU, Skoblov MYu. [Use of siRNA in cardiovascular diseases therapy]. *Clinical and Experimental Surgery.* 2014; (4): 12–9. Russian.
13. Vyakhireva JV, Zernov NV, Marakhonov AV, Guskova AA, Skoblov MYu. [Current approaches for treatment of muscular dystrophies]. *Medical Genetics.* 2016; 15 (10): 3–16. Russian.
14. Ramachandran PV, Ignacimuthu S. RNA interference--a silent but an efficient therapeutic tool. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013 Mar; 169 (6): 774–89. DOI: 10.1007/s12010-013-0098-1.
15. O'Keefe EP. siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing. *Mater Methods.* 2013; 3: 197. DOI: 10.13070/mm.en.3.197.
16. Chaudhary A, Srivastava S, Garg S. Development of a software tool and criteria evaluation for efficient design of small interfering RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jan 7; 404 (1): 313–20. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.114.
17. Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Jan; 9 (1): 57–67. DOI: 10.1038/nrd3010.

18. Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*. 2002 May 17; 296 (5571): 1270–3. DOI: 10.1126/science.1069132.
19. Applied Biosystems Inc. Reduced siRNA Concentrations Lead to Fewer Off-Target Effects. *TechNotes*. 2008; 15 (2): 13–5.
20. Zhang J, Wu Q, Wang Z, Zhang Y, Zhang G, Fu J et al. Knockdown of PSF1 expression inhibits cell proliferation in lung cancer cells in vitro. *Tumour Biol*. 2014 Nov 15; 36 (3): 2163–8. DOI: 10.1007/s13277-014-2826-8.
21. Yu D, Makkar G, Dong T, Strickland DK, Sarkar R, Monahan TS MARCKS Signaling Differentially Regulates Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cell Proliferation through a KIS-, p27kip1-Dependent Mechanism. *PLoS One*. 2015; 10 (11): e0141397. DOI: 10.1371/journal.pone.0141397.
22. Huang XH, Jian WH, Wu ZF, Zhao J, Wang H, Li W et al. Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of macrophage migration inhibitory factor (MIF) suppressed cyclin D1 expression and hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Oncotarget*. 2014 Jul; 5 (14): 5570–80. DOI: 10.18632/oncotarget.2141.
23. Takasaki S. Selecting effective siRNA target sequences by using Bayes' theorem. *Comput Biol Chem*. 2009 Oct; 33 (5): 368–72. DOI: 10.1016/j.cmpbiolchem.2009.07.009.
24. Gorodkin J, Ruzzo WL, editors. RNA Sequence, Structure, and Function: Computational and Bioinformatic Methods. Vol. 1097. New York: Springer Science+Business Media; 2014. DOI: 10.1007/978-1-62703-709-9_1.
25. Takasaki S. Methods for selecting effective siRNA target sequences using a variety of statistical and analytical techniques. *Methods Mol Biol*. 2013; 942: 17–55.
26. Lagana A, Veneziano D, Russo F, Pulvirenti A, Giugno R, Croce MC et al. Computational design of artificial RNA molecules for gene regulation. *Methods Mol Biol*. 2015; 1269: 393–412.
27. Cui W, Ning J, Nail UP, Duncan MK. OptiRNAi, an RNAi design tool. *Comput Methods Programs Biomed*. 2004 Jul; 75 (1): 67–73. DOI: 10.1016/j.cmpb.2003.09.002.
28. Naito Y, Yoshimura J, Morisita S, Ui-Tei K. siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics*. 2009 Nov 30; 10: 392. DOI: 10.1186/1471-2105-10-392.
29. Matveeva O, Nechipurenko Y, Rossi L, Moore B, Saetrom P, Ogurtsov AY et al. Comparison of approaches for rational siRNA design leading to a new efficient and transparent method. *Nucleic Acids Res*. 2007 Apr 10; 35 (8): e63. DOI: 10.1093/nar/gkm088.
30. Katoh T, Suzuki T. Specific residues at every third position of siRNA shape its efficient RNAi activity. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan 26; 35 (4): e27. DOI: 10.1093/nar/gkl1120.
31. Jiang P, Wu H, Da Y, Sang F, Wei J, Sun X et al. RFRCD-B-siRNA: improved design of siRNAs by random forest regression model coupled with database searching. *Comput Methods Programs Biomed*. 2007 Sep; 87 (3): 230–8. DOI: 10.1016/j.cmpb.2007.06.001.
32. Lu ZJ, Mathews DH. OligoWalk: an online siRNA design tool utilizing hybridization thermodynamics. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jul 1; 36 (Web Server issue): W104–8. DOI: 10.1093/nar/gkn250.
33. Ding Y, Chan CY, Lawrence CE. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul 1; 32 (Web Server issue): W135–41. DOI: 10.1093/nar/gkh449.
34. Vert JP, Foveau N, Lajaunie C, Vandenbrouck Y. An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics*. 2006 Nov 30; 7: 520. DOI: 10.1186/1471-2105-7-520.
35. Xu P, Zhang Y, Kang L, Roossinck MJ, Mysore KS. Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiol*. 2006 Oct; 142 (2): 429–40. DOI: 10.1104/pp.106.083295.
36. Tafer H, Ameres SL, Obernosterer G, Gebeshuber CA, Schroeder R, Martinez J et al. The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs. *Nat Biotechnol*. 2008 May; 26 (5): 578–83. DOI: 10.1038/nbt1404.
37. Ichihara M, Murakumo Y, Masuda A, Matsuura T, Asai N, Jijiwa M et al. Thermodynamic instability of siRNA duplex is a prerequisite for dependable prediction of siRNA activities. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35 (18): e123. DOI: 10.1093/nar/gkm699.
38. Eurofins Genomics. siMAX siRNA - The RNA Interfering Molecule, siRNA Controls, Non Specific Control 47% GC [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/custom-rna-oligos/simax-sirna.aspx>
39. Zirzow AC, Skoblov M, Patanarut A, Smith C, Fisher A, Chandhoke V et al. Nanoscale «DNA baskets» for the Delivery of siRNA. In: Herold KE, Vossoughi J, Bentley WE, editors. IFMBE Proceedings: 26th Southern Biomedical Engineering Conference SBEC 2010; 2010 Apr 30–May 2; College Park, Maryland, USA. Berlin. Heidelberg: Springer; 2010. p. 130–3.
40. Glebova KV, Marakhonov AV, Baranova AV, Skoblov MYu. Nonviral delivery systems for small interfering RNAs. *Mol Biol (Mosk)*. 2012; 46 (3): 349–61.
41. Marakhonov AV, Serzhanova VA, Skoblov MYu, Baranova AV. [Developing the system for testing siRNA delivery]. *Medical Genetics*. 2010; 9 (12): 12–5. Russian.
42. Biontix Laboratories. Metafectene Manual [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: http://www.n-genetics.com/file/Manual_METAFACTENE_en.pdf
43. Invitrogen. TRIzol™ Reagent User Guide [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf
44. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr; 162 (1): 156–9.
45. Green MR, Sambrook J, editors. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
46. Diagenode. Bioruptor User Manual [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <http://ipmb.sinica.edu.tw/microarray/index.files/BioruptorManual.pdf>
47. Thermo Fischer Scientific Inc. DNase I RNase free User Guide [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012000_DNase_I_RNasefree_1UuL_UG.pdf
48. Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem*. 2004 Mar; 50 (3): 509–15. DOI: 10.1373/clinchem.2003.026161.
49. Promega. Improm II Reverse Transcription System Protocol [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/improm-ii-reverse-transcription-system-protocol.pdf>
50. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr; 55 (4): 611–22. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.
51. Gurvich OL, Skoblov M. Real-time PCR and multiplex approaches. *Methods Mol Biol*. 2011; 784: 1–13. DOI: 10.1007/978-1-61779-289-2_1.
52. LifeTechnologies. Real-time PCR handbook [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
53. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ et al. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
54. Promega. Technical Bulletin CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-non-radioactive-cell-proliferation-assay-protocol.pdf>
55. Tang B, Qi G, Sun X, Tang F, Yuan S, Wang Z et al. HOXA7 plays a critical role in metastasis of liver cancer associated with activation of Snail. *Mol Cancer*. 2016 Sep 6; 15 (1): 57. DOI: 10.1186/s12943-016-0540-4.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ТАРГЕТНЫХ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

А. Ю. Кузеванова¹, А. С. Лунева², М. А. Маслов², А. В. Карпухин¹, А. А. Алимов¹ ✉

¹Лаборатория молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний, Медико-генетический научный центр, Москва

²Кафедра химии и технологии биологически активных соединений имени Н. А. Преображенского, Институт тонких химических технологий, Москва

Создание лекарственных средств на основе РНК-интерференции предполагает решение ряда задач, включая получение сведений о распределении по органам реципиента вводимых в его организм экзогенных малых интерферирующих РНК (миРНК). Имеющиеся данные по этому направлению исследований не являются полными и получены при помощи изотопных/флуоресцентных меток, которые не позволяют судить о сохранении первичной структуры введенного полимера. Использованный в данной работе метод анализа на основе количественной полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» позволяет решить эту проблему. Показано, что введенные внутривенно миРНК к гену *LIVIN* неравномерно распределяются между тканями и демонстрируют зависимое от дозы накопление в органах (исследование проводили на мышах, используя дозы 2,5 и 7,5 мг/кг). Максимальное накопление выявлено в печени и селезенке. Впервые обнаружено, что в этих органах концентрация анализируемой миРНК возрастает во временном интервале между 48 и 96 ч после введения. Это указывает на длительный период циркуляции миРНК в комплексе с катионными липосомами в организме. Полученные сведения актуальны для поиска эффективной терапевтической дозы, схем лечения, а также планирования доклинических и клинических исследований при разработке лекарственных препаратов на основе терапевтических миРНК.

Ключевые слова: малые интерферирующие РНК, катионные липосомы, мыши, ткани, количественная полимеразная цепная реакция

Благодарности: авторы благодарят Ольгу Коняеву и Наталию Кульбачевскую из Российского онкологического научного центра имени Н. Н. Блохина за консультативную и техническую помощь при работе с животными.

✉ **Для корреспонденции:** Алимов Андрей Анатольевич
ул. Москворечье, д. 1, г. Москва, 115478; andrei.alimov2010@yandex.ru

Статья получена: 20.06.2017 **Статья принята к печати:** 24.06.2017

DISTRIBUTION OF INTRAVENOUSLY INJECTED SMALL INTERFERING RNAs IN ORGANS AND TISSUES

Kuzevanova AY¹, Luneva AS², Maslov MA², Karpukhin AV¹, Alimov AA¹ ✉

¹Laboratory of Molecular Genetics of Complexly Inherited Diseases, Research Centre of Medical Genetics, Moscow, Russia

²Preobrazhensky Department of Chemistry and Technology of Bioactive Compounds, Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow, Russia

There are a number of problems that need to be addressed when designing an effective RNA interference-based drug including distribution of intravenously injected exogenous small interfering RNAs (siRNAs) in the organs and tissues of the patient. Insufficient data on siRNA distribution obtained using isotopic/fluorescent labeling offers no insight into whether the polymer retains its original structure after the injection. Quantitative real-time polymerase chain reaction that we used in our work provides a better response to the challenge. In our experiment *LIVIN*-specific siRNAs injected intravenously were distributed unevenly between tissues and their accumulation was dose-dependent (the study was conducted in mice using 2.5 and 7.5 mg/kg doses). Maximal accumulation was observed in the liver and spleen where siRNA concentration continued to increase between 48 and 96 hours after its administration. This demonstrates that the studied cationic liposome/miRNA complex has long circulation time. We believe that the obtained data will be instrumental in finding an effective therapeutic dose, designing adequate regimens and preparing for preclinical or clinical trials of siRNA-based drugs.

Keywords: small interfering RNA, cationic liposomes, mice, tissues, quantitative polymerase chain reaction

Acknowledgements: authors thank Olga Konyaeva and Natalia Kulbachevskaya of Blokhin Russian Cancer Research Center for providing consultations and technical assistance with the animals.

✉ **Correspondence should be addressed:** Andrei Alimov
ul. Moskvorechie, d. 1, Moscow, Russia, 115478; andrei.alimov2010@yandex.ru

Received: 20.06.2017 **Accepted:** 24.06.2017

С момента открытия механизма прямого связывания вне-сенных в цитозоль клетки малых интерферирующих РНК (миРНК) с РНК-индуцирующим комплексом выключения генов (RNA-induced silencing complex, RICS) интерес к созданию лекарственных средств на основе РНК-интерференции неуклонно растет [1]. Потенциальная возможность использования миРНК в терапевтических целях впервые была продемонстрирована при лечении модельных животных с аутоиммунным гепатитом [2]. В этих исследованиях при помощи РНК-интерференции ингибировали экспрессию гена *Fas* в гепатоцитах мыши *in vivo*. Ген кодирует рецептор, участвующий в запуске апоптоза. РНК-дуплексы вводили внутривенно в дозе 2,0–2,5 мг/кг, о проникновении введенных РНК в клетки печени судили при помощи меченного флуорохромом Су5 по 3'-концу олигонуклеотида.

Первым результативным препаратом на основе миРНК, упакованных в липосому, принято считать миРНК к апо-липопротеину В (АЛОВ), которые вводили обезьянам внутривенно в дозе 1,0–2,5 мг/кг, после чего наблюдали снижение уровня экспрессии таргетного гена на 90 % [3]. Накопление АЛОВ приводит к развитию атеросклероза. В качестве вектора использовали липосомы компании Alnylam Pharmaceuticals — iLNP, которые принято считать хорошими переносчиками миРНК в клетки. На основе этих же липосом был успешно опробован в клинике препарат для лечения амилоидной дистрофии ревусиран (*revusiran*), известный также как ALN-TTR01 [4]. Для лечения онкологических больных с использованием подобной системы доставки миРНК был создан препарат на основе миРНК к генам *VEGF* и *KSP* для лечения метастазов различного происхождения в печени [5], а также препарат для борьбы с вирусом Эбола [6]. Сведения о распределении этих комплексов между тканями и органами реципиентов ограничены и получены при помощи флуоресцентных меток [7].

В настоящее время предпринимаются многочисленные попытки найти другие эффективные способы доставки миРНК в клетки *in vivo* [8]. Среди них в качестве потенциальных векторов по переносу миРНК в клетки рассматриваются липосомы на основе катионных амфифилов [9, 10]. Возможность их использования в экспериментах *in vivo* была недавно показана в экспериментах по инактивации экспрессии гена *Bid* (ВНЗ-взаимодействующий агонист домена смерти) комплексом миРНК с коммерческим препаратом InvivoFectamine (Thermo Fisher Scientific, США). Препарат вводили внутривенно мышам в дозе 0,5–4,0 мг/кг, эффективность интерференции анализировали в ткани печени [11]. Анализ распределения препарата в организме не проводили. Вместе с тем такая информация необходима для понимания накопления препарата в органе таргетного воздействия. Кроме того, от особенностей распределения препарата в органах и тканях может зависеть характер побочных эффектов.

Цель нашего исследования — оценить распределение миРНК к гену *LIVIN*, вводимых внутривенно мышам при помощи катионных липосом, состоящих из катионного липида 1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорида и нейтрального липида 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолamina, с использованием недавно предложенного подхода на основе количественной полимеразной цепной реакции. Ген *LIVIN* является одним из генов-ингибиторов апоптоза. Он часто повышенно экспрессируется в злокачественных опухолях и рассматривается в качестве перспективной мишени для таргетной терапии с помощью миРНК [12].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные

Все эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с требованиями национального стандарта Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ 53434-2009, 2010 г.) и Приказа Минздравсоцразвития России № 708н от 13 октября 2010 г. «Об утверждении Правил лабораторной практики». Исследование одобрено локальным этическим комитетом Медико-генетического научного центра (протокол № 8 от 23.12.2016). В исследовании использовали 18 здоровых мышей — самцов линии Balb/c, полученных из разведения в Российском онкологическом научном центре имени Н. Н. Блохина, с массой тела 21–22 г. Мышей содержали в стандартных условиях со свободным доступом к корму и воде. Перед началом эксперимента все мыши прошли ветеринарное освидетельствование и были здоровы.

Животные были рандомизированы на 3 группы: группа 1 (контрольная группа) получала внутривенно физиологический раствор хлористого натрия по 0,5 мл; группа 2 — внутривенно субстанцию на основе миРНК к гену *LIVIN* в дозе 2,5 мг/кг; группа 3 — внутривенно субстанцию на основе миРНК к гену *LIVIN* в дозе 7,5 мг/кг. Перед началом эксперимента все мыши были помечены, взвешены и рассажены по клеткам по 6 мышей в каждую. Забор гистологического материала для проведения биохимического исследования осуществляли через 48 и 96 ч после внутривенного введения. Забой животных осуществляли в строгом соответствии с существующими требованиями. От каждой особи были получены образцы тканей легкого, печени, селезенки, почки и головного мозга, которые немедленно заморозили в жидком азоте и хранили до использования при –70 °С.

Определение экзогенных миРНК в тканях

Количество экзогенных миРНК в образцах тканей оценивали при помощи количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) согласно рекомендациям Liu и соавт. [13]. Пробу к экзогенной миРНК гена *LIVIN* подбирали при помощи коммерческого пакета программ Custom TaqMan Small RNA Assays Design and Ordering Guide (Applied Biosystems, США) в строгом соответствии с рекомендациями производителя. Фракцию нуклеиновых кислот выделяли из гомогенизированных в жидком азоте образцов тканей общепринятым методом с использованием протеиназы К и фенол-хлороформной экстракции. Обратную транскрипцию и количественную ПЦР проводили с использованием коммерческого набора реагентов для исследования малых РНК Custom TaqMan Small RNA Assays (Applied Biosystems) согласно рекомендациям производителя. Каждую пробу анализировали в трех повторностях. О концентрации дуплексов в образце судили по значению порогового цикла реакции *Ct*, *threshold cycle*, который соответствует моменту реакции в образце, при котором флуоресцентный сигнал достигает одинаковой пороговой величины для всех образцов данной серии. Сбор и обработку данных осуществляли при помощи коммерческого пакета программ Applied Biosystems StepOne and StepOnePlus Real-Time PCR Systems. Нормирование сигнала в каждом анализируемом образце проводили с использованием малой ядерной РНК *snoRNA202* согласно рекомендациям Wong и соавт. [14]. Относительное содержание дуплексов в

анализируемых образцах определяли при помощи программного обеспечения DataAssist v3.0 Software (Applied Biosystems) [15]. Образцом сравнения (калибратором) служил нулевой образец, полученный из той же ткани от мышей контрольной группы.

Получение инъекционной лекарственной формы

Инъекционную лекарственную форму получали в лабораторных условиях в соответствии с существующими нормативными требованиями. Катионные липосомы для проведения исследования описаны в работе Маслова и соавт. [10]. Интерферирующие РНК к гену *LIVIN* для загрузки липосом (дуплексы) получали в результате отжига двух комплементарных олигонуклеотидов так, как это было описано ранее [12]. Комплексы катионных липосом с нуклеиновыми кислотами получали в стерильной воде. На завершающем этапе к загруженным липосомам добавляли хлорид натрия до конечной концентрации 0,9 %, смесь фильтровали (размер пор фильтра — 10 мкм) и использовали в эксперименте. Конечная концентрация дуплекса в инъекционной форме составляла 0,125 мкг/мл. Минимальная инъекционная доза *in vivo* была определена на основе существующих рекомендаций для подобного коммерческого препарата Invivoectamine.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В серии предварительных экспериментов *in vitro* показано, что миРНК, трансфицированные с помощью катионных липосом в клетки, медленно элиминируются, что позволяет детектировать их в составе выделенной из культуры клеток фракции нуклеиновых кислот в течение, по крайней мере, первых 3 сут. после трансфекции (данные не опубликованы). На основании этих наблюдений был определен временной интервал забора материала в экспериментах *in vivo*. Пробы тканей отбирали через 48 и 96 ч после внутривенного введения миРНК.

В ходе исследования было установлено, что в экспериментальных группах животных, получавших внутривенно субстанцию на основе миРНК к гену *LIVIN* в дозах 2,5 мг/кг и 7,5 мг/кг, видимых проявлений токсичности не наблюдается. Анализ массы тела мышей и массы извлеченных органов в экспериментальных группах значимых отклонений от физиологической нормы не выявил. Полученные значения не отличались от значений, наблюдаемых в контрольной группе животных.

Серия подготовительных экспериментов была проведена перед началом биохимической части исследования. В частности, был определен нижний порог детекции для разработанной нами пробы. Для этого с использованием нулевого образца была построена 5-уровневая калибровочная кривая в диапазоне концентраций дуплекса (миРНК) от 23,04 пг/мл до 230 нг/мл, что позволило определить нижний предел концентрации миРНК в образце определяемой при помощи ПЦР в режиме «реального времени» с реакцией обратной транскрипции. В наших экспериментах нижний порог детекции составил 3–5 пг на реакцию, что позволило перейти к анализу распределения введенной внутривенно миРНК.

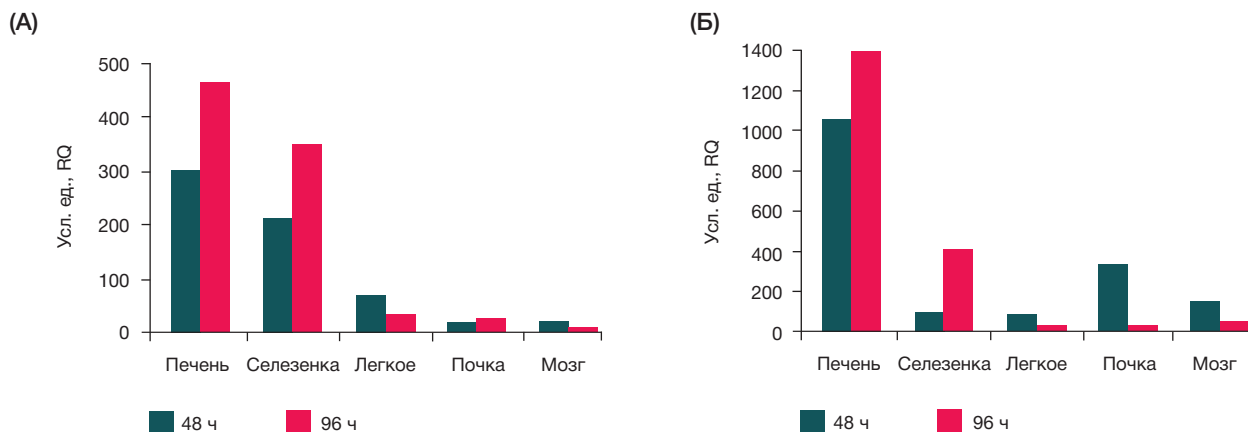
Результаты анализа представлены на рисунке. Полученные данные показали, что распределение введенных внутривенно миРНК между органами животных имеет характерный вид. Максимальное значение уровня накопления зафиксировано для ткани печени, минимальное — для ткани мозга.

Обнаружено, что аккумуляция введенных миРНК в течение первых 2 сут. находится в зависимости от дозы введенного препарата в тканях печени, почки и мозга. Этот эффект не наблюдается для тканей легкого и селезенки.

С течением времени в тканях легкого, почки и мозга происходит постепенное снижение концентрации миРНК. В тканях печени и селезенки обнаружен обратный процесс: введенные миРНК накапливаются в тканях этих органов в течение первых 4 сут. Для ответа на вопрос, элиминируются ли миРНК в дальнейшем, был проведен дополнительный эксперимент, в котором образцы тканей органов забирали через 12 дней после введения препарата в тех же дозах. Остаточных количеств препарата в тканях печени, почки, легкого и мозга обнаружено не было, что позволяет говорить об ограниченном во времени характере обнаруженного эффекта.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Информация о распределении по органам миРНК, разрабатываемым в терапевтических целях, включая терапию злокачественных опухолей, имеет существенное значение. Опухоли в органе, накапливающем миРНК, будут в большей степени подвергаться лечебному воздействию. Обнаруженная в настоящем исследовании преимущественная аккумуляция миРНК в тканях печени предполагает, что раковые опухоли в этом органе будут преимущественной мишенью препаратов на основе РНК-интерференции. Как



Накопление миРНК в органах после внутривенного введения. Статистически значимые различия по отношению к контрольной группе получены для тканей печени, селезенки, почки и легкого ($p < 0,05$). (А) Инъекционная доза 2,5 мг/кг. (Б) инъекционная доза 7,5 мг/кг

следует из впервые полученных нами данных, накопление миРНК в печени при внутривенном введении препарата пропорционально введенной дозе и продолжается, по крайней мере, в течение 4 сут.

Наблюдаемая в нашем исследовании общая картина распределения соответствует известным сведениям о распределении миРНК по органам, полученным при помощи флуоресцентных меток [7]. В то же время проведенный нами анализ дозовых и временных зависимостей позволил получить новую информацию, имеющую существенное значение. В частности, повышение дозы приводит к кратному увеличению миРНК в почке. Этот эффект наблюдается в течение 2 сут., после чего концентрация миРНК снижается. Полученные данные важны для разработки способа терапии на основе миРНК, в частности, противопухоловой, в тканях почки. Аналогичные зависимости, хотя и менее выраженные, наблюдаются в ткани мозга. Интересно, что повышение введенной дозы не оказывает влияния на концентрацию миРНК в тканях легкого и селезенки.

Полученные нами данные о зависимости уровня накопления миРНК от дозы и времени имеют прямое отношение к разработке потенциальных схем лечения. Впервые обнаруженный нами временной эффект накопления миРНК в тканях печени и селезенки не был замечен ранее для препаратов на основе РНК-интерференции и не учитывался при разработке существующих схем лечения.

Анализ динамики накопления миРНК в зависимости от дозы показал, что ткани почки особенно восприимчивы к повышению концентрации в крови препаратов на основе миРНК и катионных липосом. Это предполагает, что при разработке способа таргетного воздействия с помощью РНК-интерференции на клетки, например карциномы почки, дозу вводимых миРНК-липосомальных комплексов желательно увеличить, что должно способствовать усилению эффекта.

Получение данных обеспечила разработка метода определения миРНК, аккумулированных в тканях органов, на основе количественной ПЦР в режиме «реального времени». В отличие от подходов на основе флуоресцентных меток [2, 7] этот метод позволяет детектировать только

те миРНК, которые сохранили свою первичную структуру, обеспечивающую интерферирующую функцию [13]. То есть измеряются функционально способные миРНК, информация о которых необходима при проведении доклинических и клинических исследований.

При разработке способов терапии полученные дозовые и временные зависимости создают основу для определения оптимальных условий, обеспечивающих эффективную доставку миРНК в орган-мишень и, с другой стороны, минимизирующих накопление препарата в других органах.

В качестве тестируемой РНК-компоненты инъекционного препарата использовали миРНК к гену *LIVIN*, хорошо зарекомендовавшую себя в наших предыдущих исследованиях *in vitro* и представляющую интерес для последующего терапевтического использования [12]. Отсутствие видимых проявлений токсических эффектов в наших опытах хорошо согласуется с известными данными [2, 3, 7, 11]. Опробованные в опытах на животных дозы 2,5 и 7,5 мг/кг хорошо укладываются в существующий в настоящее время диапазон доз для большинства препаратов на основе миРНК. Использованное нами однократное введение не привело к каким-либо заметным патологическим изменениям внутренних органов или отклонений в поведении животных.

ВЫВОДЫ

Представленные в нашем исследовании результаты анализа дозовых и временных зависимостей распределения миРНК между органами после внутривенного введения позволяют заключить, что органом, наиболее восприимчивым к действию препаратов на основе РНК-интерференции, является печень. Накопление миРНК в этом органе носит зависимость от времени и дозы характер. Анализ аккумуляция миРНК другими органами показал, что повышение дозы приводит к кратному увеличению миРНК в тканях почки и мозга в течение 48 ч с последующим снижением их концентрации к 96 ч. В целом распределение миРНК между органами носит неравномерный характер, что необходимо учитывать при разработке новых таргетных препаратов на основе РНК-интерференции.

Литература

1. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001 May 24; 411 (6836): 494–8.
2. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*. 2003 Mar; 9 (3):347–51.
3. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*. 2006 May 4. 441 (7089): 111–4.
4. Coelho T, Adams D, Silva A, Lozeron P, Hawkins PN, Mant T, et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*. 2013 Aug 29; 369 (9): 819–29.
5. Tabernero J, Shapiro GI, LoRusso PM, Cervantes A, Schwartz GK, Weiss GJ, et al. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discov*. 2013 Apr; 3 (4): 406–17.
6. Geisbert TW, Lee AC, Robbins M, Geisbert JB, Honko AN, Sood V, et al. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet*. 2010 May 29; 375 (9729): 1896–905.
7. Tracy M. Progress in the Development of LNP Delivery for siRNA Advancing LNPs to the Clinic. In: *International Liposome Research Days Meeting*; 2010 Aug; Vancouver, Canada;. 2010. p. 1–52.
8. Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet*. 2015 Sep; 16 (9): 543–52.
9. Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit J-P. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*. 2008 Aug–Sep; 29 (24–25): 3477–96.
10. Maslov MA, Kabilova TO, Petukhov IA, Morozova NG, Serebrennikova GA, Vlassov VV, et al. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA. *J Controlled Release*. 2012 Jun 10; 160 (2): 182–93.
11. Eguchi A, De Mollerat Du Jeu X, Johnson CD, Nektaria A, Feldstein AE. Liver Bid suppression for treatment of fibrosis associated with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2016 Mar; 64 (3): 699–707.

12. Bavykin AS, Korotaeva AA, Poyarkov SV, Syrtsev AV, Tjulandin SA, Karpukhin AV. Double siRNA-targeting of cIAP2 and LIVIN results in synergetic sensitization of HCT-116 cells to oxaliplatin treatment. *Onco Targets Ther.* 2013 Sep 23; 6: 1333–40.
13. Liu WL, Stevenson M, Seymour LW, Fisher KD. Quantification of siRNA using competitive qPCR. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan; 37 (1): e4.
14. Wong L, Lee K, Russell I, Chen C. Application Notes & Tutorials: Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan® MicroRNA Assays [Интернет]. Версия от 28 августа 2010 г. [дата обращения: 23 июня 2017 г.]. 8 с. Доступно по: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_044972.pdf
15. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protoc.* 2008; 3 (6): 1101–8.

References

1. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001 May 24; 411 (6836): 494–8.
2. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med.* 2003 Mar; 9 (3):347–51.
3. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature.* 2006 May 4. 441 (7089): 111–4.
4. Coelho T, Adams D, Silva A, Lozeron P, Hawkins PN, Mant T, et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med.* 2013 Aug 29; 369 (9): 819–29.
5. Taberero J, Shapiro GI, LoRusso PM, Cervantes A, Schwartz GK, Weiss GJ, et al. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discov.* 2013 Apr; 3 (4): 406–17.
6. Geisbert TW, Lee AC, Robbins M, Geisbert JB, Honko AN, Sood V, et al. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet.* 2010 May 29; 375 (9729): 1896–905.
7. Tracy M. Progress in the Development of LNP Delivery for siRNA Advancing LNPs to the Clinic. In: International Liposome Research Days Meeting; 2010 Aug; Vancouver, Canada; 2010. p. 1–52.
8. Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet.* 2015 Sep; 16 (9): 543–52.
9. Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit J-P. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials.* 2008 Aug–Sep; 29 (24–25): 3477–96.
10. Maslov MA, Kabilova TO, Petukhov IA, Morozova NG, Serebrennikova GA, Vlassov VV, et al. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA. *J Controlled Release.* 2012 Jun 10; 160 (2): 182–93.
11. Eguchi A, De Mollerat Du Jeu X, Johnson CD, Nektaria A, Feldstein AE. Liver Bid suppression for treatment of fibrosis associated with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2016 Mar; 64 (3): 699–707.
12. Bavykin AS, Korotaeva AA, Poyarkov SV, Syrtsev AV, Tjulandin SA, Karpukhin AV. Double siRNA-targeting of cIAP2 and LIVIN results in synergetic sensitization of HCT-116 cells to oxaliplatin treatment. *Onco Targets Ther.* 2013 Sep 23; 6: 1333–40.
13. Liu WL, Stevenson M, Seymour LW, Fisher KD. Quantification of siRNA using competitive qPCR. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan; 37 (1): e4.
14. Wong L, Lee K, Russell I, Chen C. Application Notes & Tutorials: Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan® MicroRNA Assays [Internet]. Version: 28 Aug 2010 [cited 2017 Jun 23]. 8 p. Available from: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_044972.pdf
15. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protoc.* 2008; 3 (6): 1101–8.

ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОЙ КОЛЛАГЕНАЗЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПСОРИАЗА

Ю. А. Могилевцева¹, А. В. Мезенцев² ✉, С. А. Брускин²

¹ Российский государственный аграрный университет–МСХА имени К. А. Тимирязева, Москва

² Лаборатория функциональной геномики, отдел генетических основ биотехнологии, Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

Матриксные металлопротеиназы играют важную роль в поддержании гомеостаза кожи, заживлении ран и инициации воспалительного процесса. При псориазе матриксные металлопротеиназы участвуют в структурных перестройках эпидермиса и регуляции проницаемости микрокапилляров дермы, способствуя инфильтрации кожи клетками иммунной системы. В силу этого умение контролировать активность матриксных металлопротеиназ представляется необходимым для успешного лечения псориаза. Целью данной работы являлась оценка возможных изменений в патогенезе псориаза в результате РНК-интерференции интерстициальной коллагеназы в эпидермальных кератиноцитах. Для этого клетки трансдуцировали лентивирусными частицами, кодирующими в геноме малую интерферирующую РНК. Для анализа уровней экспрессии генов использовали метод полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени». Ферментативную активность определяли методом зимографии. Согласно полученным результатам РНК-интерференция привела к снижению уровня экспрессии гена и ферментативной активности интерстициальной коллагеназы в 20 и 4 раза соответственно. При этом экспрессия гомологичных генов (*MMP2*, *-9* и *-12*) менялась незначительно. Напротив, нами были показаны изменения в уровнях экспрессии генов цитокератинов (*KRT1*: $16,89 \pm 0,97$; *KRT14*: $2,36 \pm 0,19$; *KRT17*: $0,12 \pm 0,01$; *KRT18*: $0,56 \pm 0,02$), инволюкрина ($0,79 \pm 0,11$) и филагрина ($6,99 \pm 0,97$). Помимо этого, РНК-интерференция вызвала существенное снижение скорости миграции клеток, хотя практически не повлияла на их пролиферацию. Таким образом, терапевтический потенциал малых интерферирующих РНК, специфичных к интерстициальной коллагеназе, заключается в нормализации экспрессии важных для патогенеза псориаза генов (*IVL*, *FLG*, *KRT1*, *-14* *-17* и *-18*).

Ключевые слова: псориаз, интерстициальная коллагеназа, лентивирусы, трансдукция, трансфекция, малая интерферирующая РНК, цитокератины, инволюкрин, филаггрин

Благодарности: авторы благодарят проф. Элеонору Пирузян (Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН) за критический анализ текста рукописи и проф. Марию Лагаркову (Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН) — за предоставление необходимых для работы плазмид.

✉ **Для корреспонденции:** Мезенцев Александр Викторович
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119333; mesentsev@vigg.ru

Статья получена: 17.02.2017 **Статья принята к печати:** 25.03.2017

RNA INTERFERENCE TARGETING INTERSTITIAL COLLAGENASE IS A POTENTIAL THERAPEUTIC TOOL TO TREAT PSORIASIS

Mogilevtseva YuA¹, Mezentsev AV² ✉, Bruskin SA²

¹ Russian State Agrarian University - Timiryazev Moscow Agricultural Academy, Moscow, Russia

² Laboratory of Functional Genomics, Department of Genetics and Biotechnology, Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Matrix metalloproteinases play an important role in maintaining skin homeostasis, promote wound healing, and are involved in triggering inflammation. They are implicated in the structural changes occurring in the epidermis of psoriatic patients and also facilitate infiltration of the skin by immune cells by regulating permeability of dermal capillaries. In this light, control over the enzymatic activity of matrix metalloproteinases is crucial for a successful treatment outcome in patients with psoriasis. The aim of this work was to investigate the effect of RNA interference on the progression of psoriasis by targeting interstitial collagenase of epidermal keratinocytes. As part of the experiment, the latter were transduced with lentiviral particles that encode small hairpin RNA. Gene expression was measured by real time polymerase chain reaction. Enzymatic activity was measured by zymography. RNA interference was found to lead to a 20- and 4-fold decrease in the expression and enzymatic activity of interstitial collagenase, respectively. Expression of homologous genes (*MMP2*, *-9* and *-12*) changed insignificantly. In contrast, there were marked changes in expression of cytokeratin (*KRT1*: 16.89 ± 0.97 ; *KRT14*: 2.36 ± 0.19 ; *KRT17*: 0.12 ± 0.01 ; *KRT18*: 0.56 ± 0.02), involucrin (0.79 ± 0.11) and filaggrin (6.99 ± 0.97). Besides, RNA interference caused a significant decline in cell migration rates, although it did not affect cell proliferation. Thus, small hairpin RNAs targeting interstitial collagenase are potentially therapeutic for psoriatic patients due to their ability to regulate expression of genes implicated in psoriasis (*IVL*, *FLG*, *KRT1*, *-14*, *-17*, and *-18*).

Keywords: psoriasis, interstitial collagenase, lentiviruses, transduction, transfection, small hairpin RNA, cytokeratins, involucrin, filaggrin

Acknowledgements: the authors thank Prof. Eleonora Piruzian of Vavilov Institute of General Genetics for a critical analysis of the manuscript and Prof. Maria Lagarkova of Vavilov Institute of General Genetics for the plasmids used in this study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Aleksandr Mezentsev
ul. Gubkina, d. 3, Moscow, Russia, 119333; mesentsev@vigg.ru

Received: 17.02.2017 **Accepted:** 25.03.2017

Псориаз является наиболее распространенным дерматозом [1]. К числу основных признаков псориаза обыкновенного, на который приходится до 90 % вновь регистрируемых случаев болезни, относятся видоизменение внешнего облика кожных покровов (образование псориатических бляшек), хроническое воспаление кожи и, как следствие, инфильтрация кожи клетками иммунной системы. На молекулярном уровне для заболевания характерно изменение уровней экспрессии генов, связанных с дифференцировкой эпидермальных кератиноцитов: в пораженной болезнью коже разнонаправленно изменяются уровни экспрессии генов цитокератинов (уменьшение экспрессии *KRT1* и *KRT14* и увеличение — *KRT17* и *KRT18*), инволюкрина и филаггрина.

К сожалению, вылечить псориаз пока нельзя, а существующие медицинские препараты позволяют контролировать болезнь только в течение определенного периода времени. По этой причине поиск новых подходов к лечению псориаза остается актуальной социально значимой задачей, которая требует безотлагательного решения. Очевидно, что для разработки эффективных методов лечения заболевания необходимо знать, каким образом происходит образование псориатических бляшек и как можно воздействовать на этот процесс. В свою очередь, для этого необходимо установить основных участников патогенеза псориаза и охарактеризовать их роль в развитии патологии.

Объектом наших исследований является интерстициальная коллагеназа (ИК), которая при псориазе играет важную роль в структурных перестройках эпидермиса, взаимодействии эпидермальных кератиноцитов друг с другом, а также в регуляции проницаемости микрокапилляров дермы для клеток иммунной системы [2]. Также известно, что нарушения в экспрессии генов некоторых матриксных металлопротеиназ, включая ИК, совпадают по времени с обострением псориаза, а содержание кодируемых ими белков в пораженной болезнью ткани коррелирует со степенью тяжести заболевания. По этой причине нам представляется важным уметь контролировать металлопротеиназную активность в пораженных болезнью участках кожи.

Ранее для контроля активности матриксных металлопротеиназ предполагалось использовать их специфические ингибиторы. Однако разработка таких веществ и их внедрение в клиническую практику были признаны нецелесообразными. В одних случаях причиной отказа от использования ингибиторов была их низкая эффективность [3], в других — тяжелые побочные эффекты, которые могли представлять серьезную угрозу для жизни пациентов [4]. Одним из способов контроля экспрессии генов матриксных металлопротеиназ может стать РНК-интерференция («нокадаун») целевого гена, т. е. воздействие на пораженную болезнью область кожи препаратами, способными избирательно разрушать его транскрипты (молекулы мРНК). Например, такие препараты могли бы содержать неvirulentные вирусные частицы, которые при попадании в клетку нарабатывали бы в ней специфичную малую интерферирующую РНК (shРНК) [5, 6].

Важно отметить, что, согласно данным литературы, разные линии клеток характеризуются разной эффективностью трансфекции даже при использовании одного и того же протокола. Так, по сравнению с клетками эмбрионального почечного эпителия человека HEK293, эффективность трансфекции и трансдукции эпидермальных кератиноцитов человека HaCaT сравнительно невелики [7].

Это может происходить, по меньшей мере, по двум причинам. Во-первых, несмотря на то, что HaCaT — это иммортализованные клетки, в них в отличие от других клеточных линий продолжают работать механизмы, защищающие клетку от попадания чужеродной РНК. В частности, HaCaT экспрессируют рецепторы TLR3 и TLR7, ответственные за ее распознавание [8, 9]. Во-вторых, по своему происхождению HaCaT относятся к эпидермальным кератиноцитам. В живом организме эти клетки выполняют, прежде всего, барьерную функцию, предотвращая попадание в него микробов и вредных химических соединений, а также ослабляют действие вредного излучения (например, УФ или ионизирующей радиации). В силу этого не удивительно, что клетки HaCaT более устойчивы к действию трансфекционных реагентов чем, например, клетки внутренних органов [10]. Поэтому доставка shРНК в первичные клетки, например при проведении аналогичных экспериментов на животных, особенно в клетки кожи, представляется нам весьма нетривиальной задачей.

В работе были оценены изменения в патогенезе псориаза, вызываемые РНК-интерференцией ИК в эпидермальных кератиноцитах человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток

Клетки культивировали в среде DMEM, которая содержала L-глутамин («ПанЭко», Россия), антибиотик-антимикотик и 5 % эмбриональной сыворотки теленка (Thermo Fisher Scientific, США). В процессе роста клеток культуральную среду меняли через день. При покрытии клетками 70–75 % ростовой поверхности чашки культуру пересевали. В каждую новую чашку переносили пятую часть собранных клеток. Для подсчета клеток использовали камеру Горяева. Для анализа фотографических изображений трансдуцированных клеток (измерений площади, занятой клетками, и определения долей клеток, обладающих флуоресценцией) использовали сервисные опции Freehand selection и Cell counter программы ImageJ (NIH, США) соответственно.

Получение трансгенных эпидермальных кератиноцитов

Для получения генетически модифицированных вирионов, в геноме которых закодированы нужные для нашей работы shРНК, нами была проведена трансфекция клеток эмбрионального почечного эпителия человека HEK293 (одной из так называемых packaging cell lines) набором из четырех плазмид: pMDLg-pRRE, pREV-TRE, pCMV_VSV_G и pGPV. Плазмиды pMDLg-pRRE, pREV-TRE, pCMV_VSV_G, которые кодировали гены, участвующие в сборке вирионов, были любезно предоставлены проф. М. А. Лагарьковой (Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН). Векторы лентивирусного происхождения pGPV-17019250-ММП1 и pGPV-17019250-кММП1, в геноме которых были закодированы shРНК, были получены, как описано ранее [11, 12]. Соответственно, вектор pGPV-17019250-ММП1 использовали для получения клеток с «нокадауном» ИК, а вектор pGPV-17019250-кММП1 — для получения контрольных клеток, которые экспрессировали «бессмысленную» (контрольную) shРНК. Немаловажно также, что в исходном векторе pGPV были также закодированы гены фактора устойчивости к пуromицину и зеленого флуоресцентного белка (*PuroR* и *copGFP* соответственно),

необходимые для отбора клеток, устойчивых к упомянутому антибиотику. Непосредственно перед началом эксперимента упомянутые выше плазмиды смешивали в весовом соотношении 10 : 5 : 2 : 10. К полученному водному раствору плазмид добавляли небогатую питательную среду (DMEM) и реагент для трансфекции метафектен (Metafectene; Biontex, Германия), следуя указаниям фирмы-производителя. По окончании 15-минутной инкубации, которую проводили при комнатной температуре, раствор добавляли в культуру клеток HEK293, которая находилась в активной фазе роста (30–40 % покрытия ростовой поверхности чашки). Через 6 ч после начала трансфекции культуральную среду меняли на свежую. В течение последующих за трансфекцией четырех дней проводили отбор среды, содержащей вирионы. Собранную среду фильтровали от попавших в нее клеток (диаметр пор фильтра — 0,4 мкм) и использовали для трансдукции клеток NaCaT.

Для проведения трансдукции использовали культуры эпидермальных кератиноцитов человека NaCaT, находившиеся в фазе активного роста (не более 60 % покрытия ростовой поверхности чашки) и питательную среду, собранную при проведении трансфекции клеток HEK293. В течение 4 дней, следующих за трансфекцией HEK293, питательную среду в чашках с NaCaT заменяли фильтрованной средой, собранной при трансфекции HEK293. Затем в течение недели, следующей за трансдукцией, клетки культивировали в питательной среде, которая содержала 5 мкг/мл пурамицина (Thermo Fisher Scientific), для того чтобы провести их селекцию на устойчивость к данному антибиотику. Таким образом, в результате трансдукции были получены две новые линии клеток (NaCaT-ИК и NaCaT-КТП) с различным уровнем экспрессии ИК.

Получение клеточного гомогената

Для получения гомогенатов использовали культуры клеток, покрывавшие 60–70 % ростовой поверхности чашки. Клетки ресуспендировали в буфере RIPA следующего состава: 25 мМ ТРИС, 150 мМ NaCl, 0,1 % додецилсульфат натрия, 0,5 % дезоксихолат натрия, 1 % NP-40, pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific). Буфер охлаждали до температуры 2–8 °С до полного разрушения клеток (1–2 мин) из расчета 500 мкл буферного раствора на флакон (общая площадь флакона — 25 см²).

Определение концентрации белка

Для определения концентрации белка использовали флуориметрический метод и набор реагентов Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с указаниями фирмы-производителя.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле и зимография

Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле использовали метод Лэммли [13, 14]. Концентрация акриламида в разделяющем и концентрирующем гелях составляла 10 и 5 % соответственно. Для проведения зимографии использовали 10 % полиакриламидный гель, содержащий 4 мг/мл коллагена (Thermo Fisher Scientific). Компоненты геля смешивали на ледяной бане при температуре 2–8 °С, а его полимеризацию проводили при комнатной температуре. Для электрофоретического раз-

деления белков и последующей обработки геля использовали ранее опубликованный протокол [15]. Количественную оценку ферментативной активности ИК проводили методом денситометрии, используя сервисную опцию Gels программы ImageJ.

Получение суммарной РНК

Для выделения суммарной РНК из клеток использовали TRIzol (Thermo Fisher Scientific), как описано ранее [16]. Качество препаратов РНК проверяли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле в неденатурирующих условиях. Для измерения концентрации РНК использовали флуориметрический метод и набор реагентов Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с указаниями фирмы-производителя.

ПЦР в режиме «реального времени»

Перед проведением эксперимента из образцов выделенной РНК получали кДНК, используя набор реагентов MMLV RT («Евроген») в соответствии с указаниями фирмы-производителя. При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени» использовали праймеры выбранных генов из базы данных Probe [17], образцы кДНК и набор реагентов qPCRMix-HS SYBR + HighROX («Евроген»). Для приготовления проб указанные компоненты смешивали между собой в соответствии с указаниями фирмы-производителя. Общий объем пробы составлял 25 мкл, конечная концентрация праймеров — 1 мкМ, а предполагаемая концентрация кДНК — 4 мкг/мл. Эксперименты проводили на приборе Eco (Illumina, США) в 48-луночных планшетах, предоставленных фирмой-производителем прибора, в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Температура амплификации составляла 60 °С. Перед началом эксперимента планшеты запечатывали прозрачной пленкой. После этого, чтобы избежать неравномерного распределения содержимого проб в лунках, планшеты центрифугировали (100 г; 3 мин; 18 °С). Полученные результаты нормализовали к уровню экспрессии гена *ACTB*. Результаты анализировали при помощи программы Eco, предоставленной производителем прибора. Экспериментальный дизайн предполагал использование трех биологических повторов для каждой из проб. Помимо этого каждый эксперимент повторяли трижды.

Количественная оценка пролиферации клеток

Для количественной оценки пролиферации в 6-луночные планшеты высевали по 40 000 клеток на лунку. Ежедневно случайно выбранные образцы обрабатывали 0,25 % раствором трипсина-ЭДТА («ПанЭко»), после чего, используя камеру Горяева, в них определяли количество клеток. Данные по образцам использовали для построения кривых роста. Результаты представляли в линейных координатах. Каждый эксперимент повторяли трижды.

Количественная оценка миграции клеток

Для проведения количественной оценки миграции клетки культивировали до тех пор, пока они полностью не покрывали поверхность культуральной чашки. Перед началом эксперимента, используя носик для автоматической пипетки, по поверхности чашки проводили прямую линию, очищая от клеток полосу шириной ~1,25 мм. Полученные

таким образом образцы культивировали в течение 5–6 дней, ежедневно фотографируя участки не занятых клетками областей. Для количественной оценки свободной от клеток ростовой поверхности использовали сервисную опцию Freehand selection программы ImageJ.

Статистическая обработка результатов

Результаты измерений представляли в виде: среднее значение \pm стандартное отклонение ($m \pm SD$). Для сравнения средних значений двух и более групп использовали однофакторный дисперсионный анализ. Если вероятность ошибки при отклонении нулевой гипотезы не превышала 0,05, то статистические различия между средними величинами считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение лентивирусных частиц

При проведении трансфекции флуоресценция трансфицированных НЕК293 была заметна уже на следующий день после начала эксперимента, а в последующие дни доля флуоресцирующих клеток возрастала до 75–85 % (рис. 1А). Помимо этого, нами было установлено, что трансфекция вектором, который кодирует shRNA, специфичную к ИК, влияет на прикрепление клеток к ростовой поверхности. Так, в отличие от клеток, трансфицированных вектором, кодирующим контрольную shRNA (НЕК293-КТР), клетки, трансфицированные вектором, кодирующим специфичную shRNA (НЕК293-ИК), остаются в прикрепленном состоянии при «подкислении» среды, которое можно было наблюдать при их продолжительном культивировании, и требуют обработки трипсином при необходимости пересеять культуру.

Получение эпидермальных кератиноцитов с экспрессией shRNA и их последующая селекция на устойчивость к пурамицину

При проведении трансдукции клеток HaCaT флуоресценция в трансдуцированных клетках была заметна на второй день проведения эксперимента. При этом доля флуоресцирующих клеток в образцах не превышала ~10 % (рис. 1Б). На третий и четвертый день доля клеток HaCaT с флуоресценцией возрастала до 35–50 %.

Полученные образцы клеток проверяли на устойчивость к антибиотику пурамицину. В течение первых 3 дней культивирования происходило резкое снижение количества клеток. При этом нетрансдуцированные клетки (отрицательный контроль) оказались неустойчивы к действию антибиотика (рис. 1В). Напротив, количество жизнеспособных клеток в других образцах составило ~15–25 % от общего числа клеток, обработанных антибиотиком.

Помимо этого, нами было установлено, что клетки, трансдуцированные вирионами, кодирующими shRNA, специфичную к ИК (HaCaT-ИК), и контрольную shRNA (HaCaT-КТР), различаются по своим морфологическим признакам. Так, клетки HaCaT-ИК образовывали колонии с резко очерченными границами (рис. 2А). При этом сами клетки часто располагались одна над другой, что свидетельствовало об образовании между ними более прочных по сравнению с клетками HaCaT-КТР контактов (рис. 2Б). Напротив, HaCaT-КТР сохраняли характерные для не-

трансдуцированных клеток морфологические признаки: границы образованных ими колоний были «размыты», а по достижении конfluence клетки образовывали правильную монослой.

Особенности профиля генной экспрессии в трансдуцированных клетках

Использование РНК-интерференции позволило снизить уровень экспрессии гена ИК примерно в 20 раз. При этом анализ уровней экспрессии генов, кодирующих матриксные металлопротеиназы (*MMP2*, *MMP9* и *MMP12*), проведенный методом количественной ПЦР, не выявил статистически значимых изменений (рис. 3А). Напротив, нами были обнаружены изменения в уровнях экспрессии генов инволюцина и филаггрина (0.79 ± 0.11 и 6.99 ± 0.97 соответственно, рис. 3Б). В здоровой коже упомянутые гены играют ключевую роль в дифференцировке эпидермальных кератиноцитов. Помимо этого, в клетках с недостатком ИК происходят изменения в экспрессии генов, кодирующих характерные для эпидермиса здоровой и пораженной псориазом кожи цитокератины (рис. 3В). Так, в клетках HaCaT-ИК по сравнению с клетками HaCaT-КТР экспрессия первых (*KRT1* и *KRT14*) возрастала в $16,89 \pm 0,97$ и $2,36 \pm 0,19$ раз соответственно, а экспрессия вторых (*KRT17* и *KRT18*) снижалась до $0,12 \pm 0,01$ и $0,56 \pm 0,02$ соответственно.

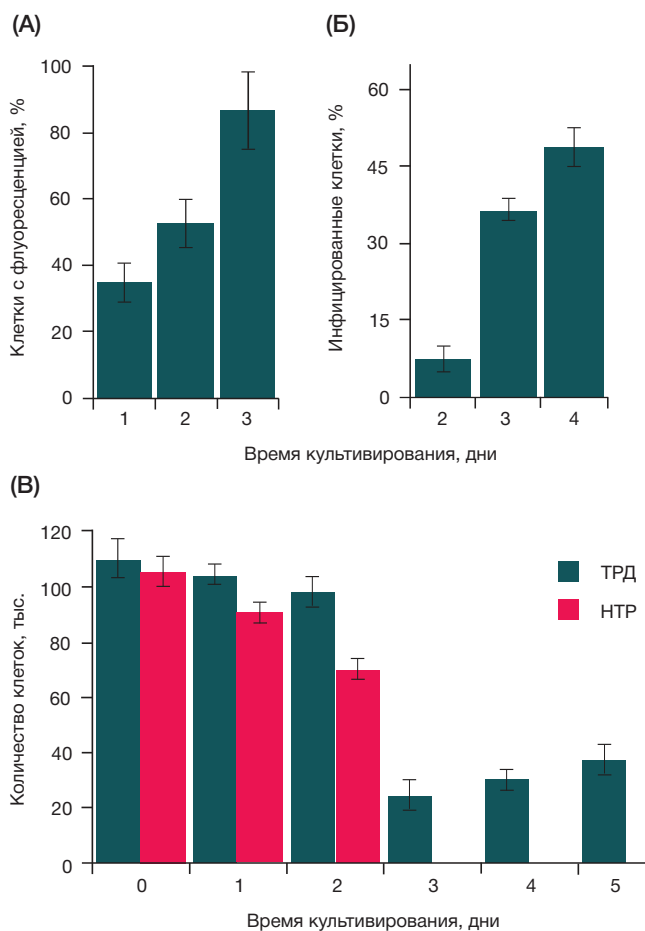


Рис. 1. Лентивирусная трансдукция клеток. (А) Изменение доли флуоресцирующих клеток НЕК293 при проведении трансфекции; (Б) Изменение доли флуоресцирующих клеток HaCaT при проведении трансдукции; (B) Изменение числа клеток в образцах при отборе клеток, устойчивых к пурамицину. TRD — трансдуцированные клетки; NTR — нетрансдуцированные клетки (отрицательный контроль). Трансдукцию и трансфекцию клеток проводили так, как описано в разделе «Материалы и методы»

Пролиферация и миграция трансдуцированных клеток

Анализ кривых роста клеток HaCaT-ИК и HaCaT-КТР не выявил достоверных отличий (рис. 4А). Напротив, сравнение скоростей миграции клеток показало, что РНК-интерференция ИК влияет на скорость миграции (рис. 4Б). В то время как клетки HaCaT-КТР за 5 дней культивирования покрывали ~85 % свободной поверхности, аналогичный показатель для HaCaT-ИК составил менее 40 % (рис. 4В).

Изменения ферментативной активности ИК в трансдуцированных клетках

Сравнение ферментативной активности секретируемой ИК показало, что обе линии трансдуцированных клеток синтезируют секретируемые коллагеназы (ИК, MMP2 и MMP9) и секретируют их в питательную среду (рис. 5А и Б). При этом в HaCaT-ИК по сравнению с HaCaT-КТР уровень экспрессии ИК, согласно результатам денситометрии, снижен в 4 раза (рис. 5В). В дополнение анализ клеточных гомогенатов позволяет детектировать незначительные количества про-MMP1 в образцах, полученных из HaCaT-КТР. При этом в клеточных гомогенатах HaCaT-ИК существенного накопления ИК не происходит (рис. 5Б и В).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе нами были получены клеточные линии иммортализованных эпидермальных кератиноцитов человека: HaCaT-КТР, экспрессировавшие «бесмысленную» (контрольную) shРНК, которые в дальнейшем использовали в качестве контроля, и HaCaT-ИК, экспрессировавшие shРНК, специфичную к ИК. Нами были охарактеризованы морфологические особенности клеток HaCaT-КТР и HaCaT-ИК (рис. 2). Мы также показали, что экспрессия shРНК, специфичной к ИК, влияет на скорость миграции клеток (рис. 4В), но практически не влияет на скорость их пролиферации (рис. 4А). Наконец, нами были установлены изменения в уровнях экспрессии генов цитokerатинов (*KRT1*, *-14*, *-17* и *-18*), а также генов инволюкрина (*IVL*) и филагрина (*FLG*), которые играют ключевую роль в дифференцировке эпидермальных кератиноцитов (рис. 3).

Примечательно, что в процессе культивирования трансдуцированных клеток мы наблюдали между ними отличия по морфологическим признакам. При культивировании HaCaT-ИК колонии этих клеток имели резко очерченные границы, а многие из клеток располагались друг над другом (рис. 2А). Напротив, клетки HaCaT-КТР сохраняли облик, характерный для нетрансфицированных

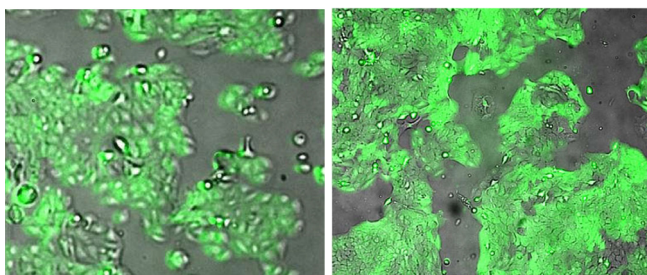


Рис. 2. Влияние экспрессии miРНК на морфологические характеристики трансдуцированных клеток. (А) Клетки, экспрессирующие контрольную shРНК. (Б) Клетки, экспрессирующие shРНК, специфичную к интерстициальной коллагеназе. Трансдукцию клеток HaCaT проводили так, как описано в разделе «Материалы и методы»

клеток. Границы колоний, образованных этими клетками, были размыты, а при продолжительном культивировании HaCaT-КТР образовывали правильный монослой (рис. 2Б). По причине же того, что геномы клеток отличались только по одному из генов (гену, который кодировал shРНК), мы сделали заключение, что наблюдаемые морфологические различия между HaCaT-ИК и HaCaT-КТР вызваны непосредственно РНК-интерференцией ИК.

Согласно данным литературы (например, [2]), ИК регулирует образование межклеточных контактов, а также перемещение клеток, например при повреждении кожных покровов. Например, клетки с высоким уровнем экспрессии ИК (такие как инвазивные раковые клетки) слабо взаимодействуют друг с другом, но при этом обладают высокой мобильностью. Напротив, подавление экспрессии ИК в этих клетках, например при помощи специфичной РНК-интерференции, способствует образованию между ними межклеточных контактов, а также замедляет их

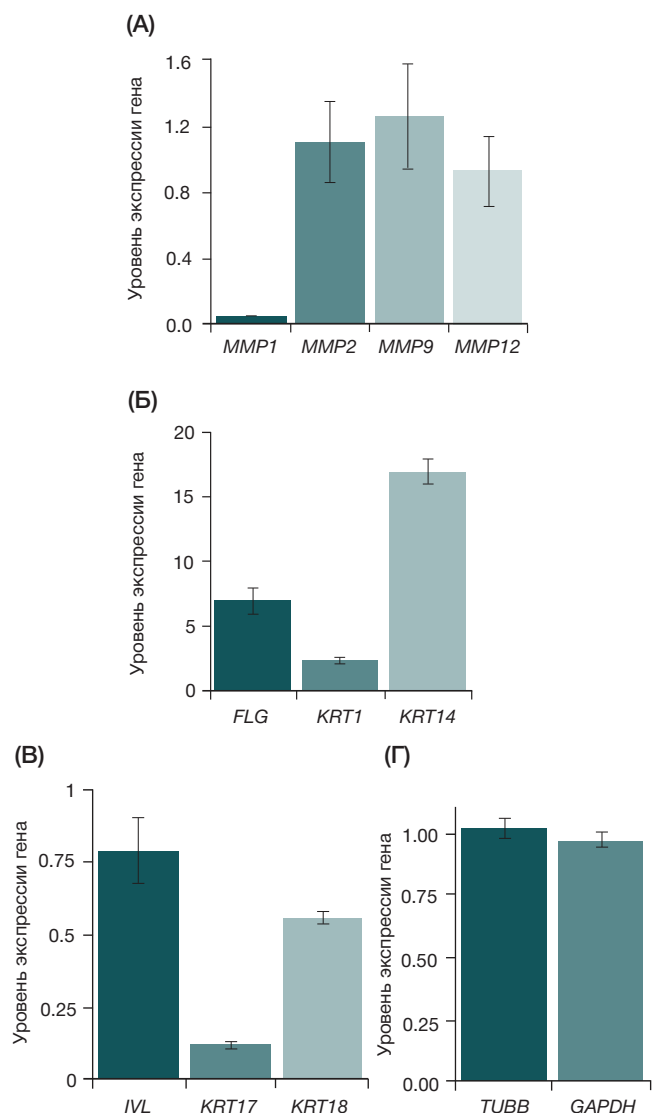


Рис. 3. Оценка изменений генной экспрессии в трансдуцированных эпидермальных кератиноцитах человека методом количественной ПЦР. (А) Изменения в экспрессии матричных металлопротеиназ. (Б) и (В) Изменения в экспрессии генов с повышенной и пониженной экспрессией соответственно. (Г) Экспрессия генов «домашнего хозяйства». Данные измерений нормировали по уровню экспрессии гена *ACTB*. На рисунке показаны результаты сравнения генной экспрессии в эпидермальных кератиноцитах, экспрессирующих shРНК, специфичную к интерстициальной коллагеназе и контрольную shРНК (см. раздел «Материалы и Методы»)

миграцию, что, в свою очередь, снижает риск образования метастазов в удаленных органах и тканях животных-реципиентов [18]. В силу этого неудивительно, что в наших экспериментах были получены похожие результаты. Клетки HaCaT-ИК образовывали более прочные межклеточные контакты между собой и мигрировали со скоростью примерно в 2,5 раза меньшей, чем клетки HaCaT-KTP (рис. 4Б и В). Аналогичные изменения, такие как более прочное взаимодействие клеток с ростовой поверхностью, мы также наблюдали и при проведении трансфекции НЕК293 вектором, который кодировал shРНК, специфичную к ИК.

Далее, принимая во внимание особенности строения эпидермиса, следует заметить, что способностью к миграции обладают, как правило, недифференцированные и слабодифференцированные клетки базального слоя, число которых возрастает в пораженных псориазом участках кожи. Напротив, клетки, находящиеся на более поздних стадиях дифференцировки, прочно связаны друг с другом десмосомами. По этой причине мы предположили, что наблюдаемые морфологические изменения в HaCaT-ИК могут быть связаны не только со снижением активности ИК, но и с инициацией процесса дифференцировки этих клеток.

Как уже было показано ранее, резкие изменения в экспрессии одного из генов, такие как его «суперэкспрессия» или «нокаут» способны кардинальным образом перестроить работу всего организма и вызвать существенные изменения в экспрессии, по меньшей мере, нескольких сотен других генов [20, 21]. РНК-интерференция, напротив, позволяет откорректировать уровень генной экспрессии до необходимого значения, например за счет использования в эксперименте нуклеотидных последовательностей с различным родством к специфичной мРНК, а также подбора необходимого для проведения трансдукции количества вирусных частиц. Так, сравнение уровней экспрессии генов в HaCaT-ИК и HaCaT-KTP, выполненное методом количественной ПЦР, показало, что почти двадцатикратное снижение уровня экспрессии гена, кодирующего ИК (*MMP1*), вследствие РНК-интерференции не привело к существенным изменениям в уровне экспрессии генов других (гомологических) матриксных металлопротеиназ, таких как *MMP2*, -9 и -12 (рис. 3А).

Отсутствие статистически значимых изменений в уровне экспрессии этих генов важно, по крайней мере, по двум причинам. Прежде всего, это говорит в пользу того, что нам удалось селективно блокировать биосинтез ИК, не затрагивая экспрессию генов, сиквенс которых имеет высокую степень гомологии с мРНК ИК. Кроме того, полученный результат представляется нам также очень важным в контексте специфичности наблюдаемых нами фенотипических изменений клеток (рис. 2).

В то же время количественная оценка активности ИК, выполненная методом денситометрии, показала, что РНК-интерференция приводит только к четырехкратному снижению активности фермента в культуральной среде (рис. 5Б). При этом мы не наблюдали существенного накопления ИК внутри клеток (рис. 5Б). Наблюдаемые различия в изменениях уровня экспрессии гена ИК (рис. 3А) и уровне ферментативной активности белка (рис. 5Б), по нашему мнению, вызваны превышением верхней границы чувствительности метода денситометрии. Дело в том, что интенсивность наблюдаемых в геле полос может расти пропорционально до определенного предела. Соответственно, сравнительно небольшая разница в оценке

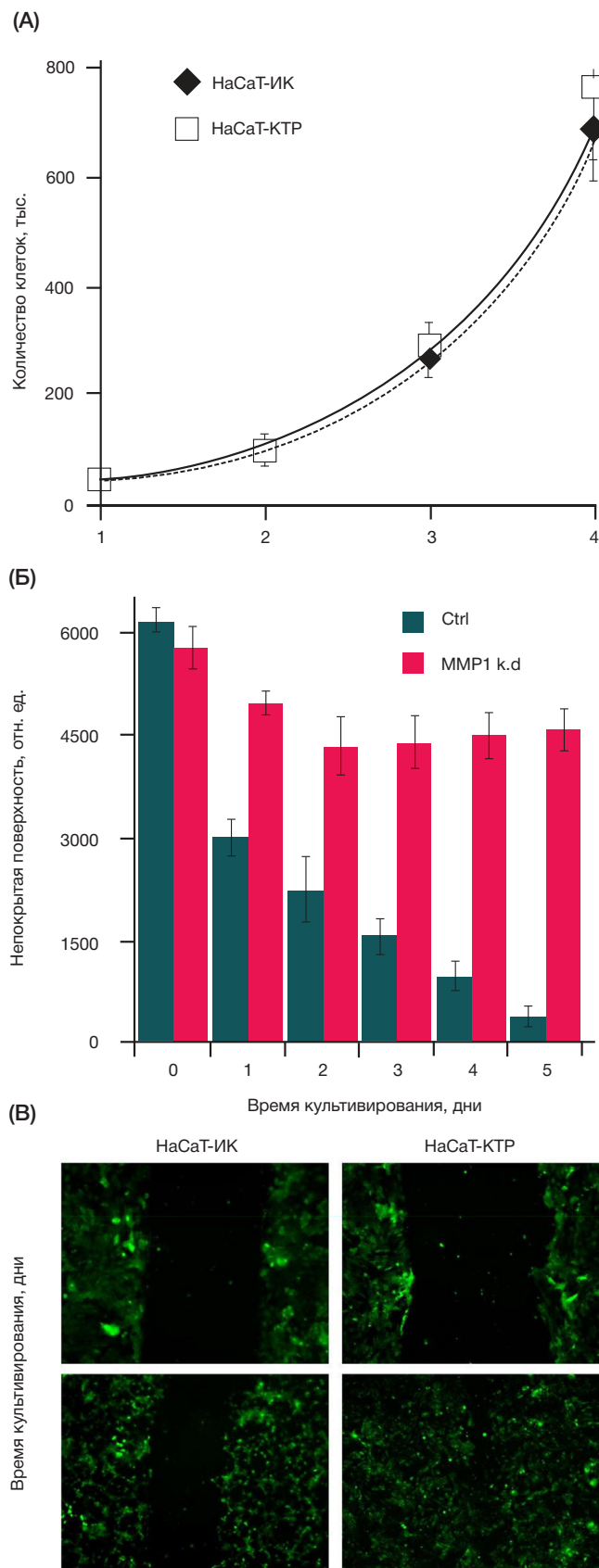


Рис. 4. Влияние экспрессии shРНК, специфичной к интерстициальной коллагеназе (ИК), на пролиферацию и миграцию трансдуцированных клеток. Анализ кривых роста (А) и количественная оценка скорости миграции (Б) клеток HaCaT, экспрессирующих shРНК, специфичную к ИК и контрольную shРНК. (В) Миграция трансдуцированных клеток: состояние культур на следующий день после начала эксперимента и по его окончании. Детали экспериментальных процедур описаны в разделе «Материалы и методы»

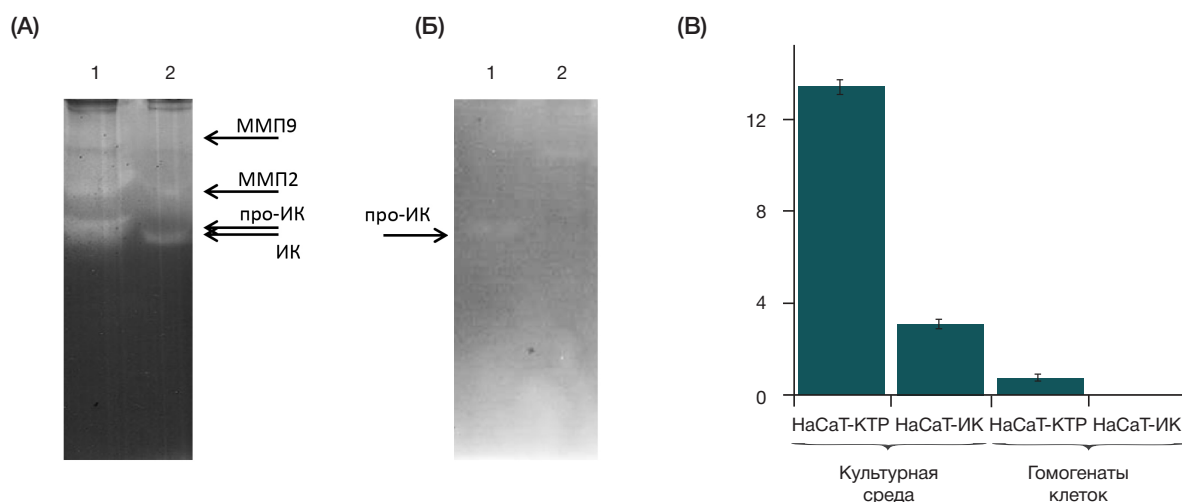


Рис. 5. Оценка ферментативной активности интерстициальной коллагеназы (ИК) в трансдуцированных эпидермальных кератиноцитах клеточном гомогенате и культуральной среде. **(А)** Зимография образцов питательной среды, собранных при культивировании трансдуцированных клеток: 1 — клетки, экспрессировавшие контрольную shРНК; 2 — клетки, экспрессировавшие shРНК, специфичную к ИК. Стрелками указано месторасположение матричных металлопротеиназ в геле. **(Б)** Зимография образцов клеточного гомогената, собранных при культивировании трансдуцированных клеток: 1 — клетки, экспрессировавшие контрольную shРНК; 2 — клетки, экспрессировавшие shРНК, специфичную к ИК. **(В)** Количественная оценка ферментативной активности. Время культивирования клеток до начала сбора образцов — 48 ч. Конфлюэнтность клеток на момент сбора образцов — 60 %. Культивирование клеток, получение гомогената, а также проведение белкового электрофореза и зимографии описаны в разделе «Материалы и методы»

ферментативной активности между образцами могла быть вызвана «перегрузкой» ИК в образце, полученном из HaCaT-KTRP.

Между тем, сравнение уровней генной экспрессии в клетках HaCaT-IK и HaCaT-KTRP позволило нам установить статистически значимые изменения в уровнях экспрессии генов цитокератинов (*KRT1*, *-14*, *-17* и *-18*). Примечательно, что наблюдаемые изменения носили разнонаправленный характер (рис. 3В). В частности, нами было установлено, что экспрессия *KRT1* и *KRT14* возросла, тогда как экспрессия *KRT17* и *KRT18* — снижалась. Согласно данным литературы, изменения в уровнях экспрессии упомянутых генов имеют важное физиологическое и клиническое значение. С одной стороны, нормальный уровень экспрессии *KRT1* и *KRT14* в эпидермисе здоровой кожи важен для правильной дифференцировки эпидермальных кератиноцитов [22]. С другой стороны, в области кожи, пораженной псориазом, где процесс дифференцировки клеток нарушен, возрастает экспрессия *KRT17* и *KRT18*, а экспрессия *KRT1* и *KRT14* — снижается [23, 24]. Согласно же полученным нами данным (рис. 3В), РНК-интерференция ИК может иметь важный терапевтический эффект в случае псориаза, поскольку она частично нормализует экспрессию генов упомянутых цитокератинов (снижает экспрессию *KRT17* и *KRT18* и увеличивает экспрессию *KRT1* и *KRT14*).

Помимо этого, РНК-интерференция ИК приводит к изменениям в уровнях экспрессии генов *IVL* и *FLG* (рис. 3Б). Белки, кодируемые этими генами (инволюкрин и филлагрин соответственно), являются важными структурными элементами верхнего (рогового) слоя эпидермиса. Они относятся к числу маркеров «ранней» и «поздней» стадий дифференцировки эпидермальных кератиноцитов. В свою

очередь, образование псориазических бляшек сопровождается нарушениями в экспрессии упомянутых генов: экспрессия *IVL* увеличивается, а экспрессия *FLG* снижается [25]. Соответственно, нарушается состав и структура роговой оболочки и меняется внешний облик кожных покровов. Согласно полученным нами данным (рис. 3Б), РНК-интерференция ИК частично нормализует экспрессию *IVL* и *FLG* в трансдуцированных клетках, что усиливает ее терапевтический эффект.

Примечательно, что в отличие от других исследуемых в нашей работе генов (рис. 3А–В) экспрессия генов «домашнего хозяйства» *TUBB* и *GAPDH*, широко используемых в современной лабораторной практике в качестве внутреннего контроля, существенно не меняется (рис. 3Д). Это, в свою очередь, свидетельствует о возможности использования данных об уровне экспрессии гена *ACTB* для нормализации результатов ПЦР в режиме «реального времени» в клетках HaCaT-KTRP и HaCaT-IK.

ВЫВОДЫ

В заключение мы бы хотели отметить, что полученные нами клеточные линии эпидермальных кератиноцитов — HaCaT-IK с экспрессией shРНК, специфичной к ИК, и HaCaT-KTRP с экспрессией контрольной shРНК — различаются по своим морфологическим признакам и способности к миграции. Сравнительный анализ генной экспрессии в трансдуцированных клетках показал, что РНК-интерференция ИК обладает потенциальным терапевтическим эффектом, поскольку приводит к коррекции уровней экспрессии ряда важных для патогенеза псориаза генов: *IVL*, *FLG*, *KRT1*, *-14*, *-17* и *-18*.

Литература

1. Sabat R, Philipp S, Höflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K et al. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol.* 2007; 16 (10): 779–98. PubMed PMID: 17845210.
2. Mezentsev A, Nikolaev A, Bruskin S. Matrix metalloproteinases

and their role in psoriasis. *Gene.* 2014; 540 (1): 1–10. PubMed PMID: 24518811.

3. Corbitt CA, Lin J, Lindsey ML. Mechanisms to inhibit matrix metalloproteinase activity: where are we in the development of

- clinically relevant inhibitors? Recent Pat Anticancer Drug Discov. 2007; 2 (2): 135–42. PubMed PMID: 18221058.
4. Peterson JT. The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. *Cardiovasc Res.* 2006; 69 (3): 677–87. PubMed PMID: 16413004.
 5. Shi Q, Zhang XL, Dai KR, Benderdour M, Fernandes JC. siRNA therapy for cancer and non-lethal diseases such as arthritis and osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2011; 11 (1): 5–16. PubMed PMID: 21058934.
 6. Schambach A, Baum C. Clinical application of lentiviral vectors - concepts and practice. *Curr Gene Ther.* 2008; 8 (6): 474–82. PubMed PMID: 19075630.
 7. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996; 272 (5259): 263–7. PubMed PMID: 8602510.
 8. Köllisch G, Kalali BN, Voelcker V, Wallich R, Behrendt H, Ring J et al. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology.* 2005; 114 (4): 531–41. PubMed PMID: 15804290.
 9. Oлару F, Jensen LE. Chemokine expression by human keratinocyte cell lines after activation of Toll-like receptors. *Exp Dermatol.* 2010; 19 (8): e314–6. PubMed PMID: 20100199.
 10. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008; 17 (12): 1063–72. PubMed PMID: 19043850.
 11. Могилевцева Ю., Мезенцев А. В. Клонирование последовательности малой ингибирующей РНК, специфичной к металлопротеиназе 1 человека, в экспрессионный вектор рGPV-17019250. *Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe.* 2016; (9): 85–92.
 12. Могилевцева Ю., Мезенцев А. В. Молекулярный дизайн и клонирование контрольной РНК для проведения экспериментов по РНК-интерференции интерстициальной коллагеназы человека. В сб.: Сборник статей студентов, магистрантов, аспирантов, молодых ученых и преподавателей «Развитие современной науки: теоретические и прикладные аспекты»; 4 августа 2016 г.; Пермь, 2016; (6): 70–7.
 13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227 (5259): 680–5. PubMed PMID: 5432063.
 14. Meyer TS, Lamberts BL. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim Biophys Acta.* 1965; 107 (1): 144–5. PubMed PMID: 4159310.
 15. Gogly B, Groult N, Hornebeck W, Godeau G, Pellat B. Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. *Anal Biochem.* 1998; 255 (2): 211–6. PubMed PMID: 9451506.
 16. Chomczynski P, Mackey K. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques.* 1995; 19 (6): 942–5. PubMed PMID: 8747660.
 17. Probes [Интернет]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); [протитировано 10 февраля 2017 г.]. Доступно по ссылке: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/>
 18. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010; 141 (1): 52–67. PubMed PMID: 20371345.
 19. Momota Y, Suzuki N, Kasuya Y, Kobayashi T, Mizoguchi M, Yokoyama F et al. Laminin $\alpha 3$ LG4 module induces keratinocyte migration: involvement of matrix metalloproteinase-9. *J Recept Signal Transduct Res.* 2005; 25 (1): 1–17. PubMed PMID: 15960391.
 20. Swindell WR, Johnston A, Carbajal S, Han G, Wohn C, Lu J et al. Genome-wide expression profiling of five mouse models identifies similarities and differences with human psoriasis. *PLoS One.* 2011; 6 (4): e18266. PubMed PMID: 21483750.
 21. Zhang X, Jin JY, Wu J, Qin X, Streilein R, Hall RP et al. RNA-Seq and ChIP-Seq reveal SQSTM1/p62 as a key mediator of JunB suppression of NF- κ B-dependent inflammation. *J Invest Dermatol.* 2015; 135 (4): 1016–24. PubMed PMID: 25501661.
 22. Matsui T, Amagai M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol.* 2015; 27 (6): 269–80. PubMed PMID: 25813515.
 23. Rao KS, Babu KK, Gupta PD. Keratins and skin disorders. *Cell Biol Int.* 1996; 20 (4): 261–74. PubMed PMID: 8664850.
 24. Al Robaee AA. Molecular genetics of Psoriasis (Principles, technology, gene location, genetic polymorphism and gene expression). *Int J Health Sci (Qassim).* 2010; 4 (2): 103–27.
 25. Iizuka H, Takahashi H, Honma M, Ishida-Yamamoto A. Unique keratinization process in psoriasis: late differentiation markers are abolished because of the premature cell death. *J Dermatol.* 2004; 31 (4) 271–6.

References

1. Sabat R, Philipp S, Höflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K et al. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol.* 2007; 16 (10): 779–98. PubMed PMID: 17845210.
2. Mezentsev A, Nikolaev A, Bruskin S. Matrix metalloproteinases and their role in psoriasis. *Gene.* 2014; 540 (1): 1–10. PubMed PMID: 24518811.
3. Corbitt CA, Lin J, Lindsey ML. Mechanisms to inhibit matrix metalloproteinase activity: where are we in the development of clinically relevant inhibitors? *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2007; 2 (2): 135–42. PubMed PMID: 18221058.
4. Peterson JT. The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. *Cardiovasc Res.* 2006; 69 (3): 677–87. PubMed PMID: 16413004.
5. Shi Q, Zhang XL, Dai KR, Benderdour M, Fernandes JC. siRNA therapy for cancer and non-lethal diseases such as arthritis and osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2011; 11 (1): 5–16. PubMed PMID: 21058934.
6. Schambach A, Baum C. Clinical application of lentiviral vectors - concepts and practice. *Curr Gene Ther.* 2008; 8 (6): 474–82. PubMed PMID: 19075630.
7. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996; 272 (5259): 263–7. PubMed PMID: 8602510.
8. Köllisch G, Kalali BN, Voelcker V, Wallich R, Behrendt H, Ring J et al. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology.* 2005; 114 (4): 531–41. PubMed PMID: 15804290.
9. Oлару F, Jensen LE. Chemokine expression by human keratinocyte cell lines after activation of Toll-like receptors. *Exp Dermatol.* 2010; 19 (8): e314–6. PubMed PMID: 20100199.
10. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008; 17 (12): 1063–72. PubMed PMID: 19043850.
11. Mogilevtseva Yu, Mezentsev AV. Klonirovanie posledovatel'nosti maloy ingibiruyushchey RNK, spetsifichnoy k metalloproteinaze 1 cheloveka, v ekspressionnyy vektor pGPV-17019250. *Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe.* 2016; (9): 85–92. Russian.
12. Mogilevtseva Yu, Mezentsev AV. Molekulyarnyy dizayn i klonirovanie kontrol'noy RNK dlya provedeniya eksperimentov po RNK-interferentsii interstitsial'noy kollagenazy cheloveka. In: *Sbornik statey studentov, magistrantov, aspirantov, molodykh uchenykh i prepodavateley «Razvitie sovremennoy nauki: teoreticheskie i prikladnye aspekty»;* 2016 Aug 4; Perm, 2016; (6): 70–7. Russian.
13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227 (5259): 680–5. PubMed PMID: 5432063.
14. Meyer TS, Lamberts BL. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim Biophys Acta.* 1965;

- 107 (1): 144–5. PubMed PMID: 4159310.
15. Gogly B, Groult N, Hornebeck W, Godeau G, Pellat B. Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. *Anal Biochem.* 1998; 255 (2): 211–6. PubMed PMID: 9451506.
 16. Chomczynski P, Mackey K. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques.* 1995; 19 (6): 942–5. PubMed PMID: 8747660.
 17. Probes [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); [cited 2017 Feb 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/>
 18. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010; 141 (1): 52–67. PubMed PMID: 20371345.
 19. Momota Y, Suzuki N, Kasuya Y, Kobayashi T, Mizoguchi M, Yokoyama F et al. Laminin $\alpha 3$ LG4 module induces keratinocyte migration: involvement of matrix metalloproteinase-9. *J Recept Signal Transduct Res.* 2005; 25 (1): 1–17. PubMed PMID: 15960391.
 20. Swindell WR, Johnston A, Carbajal S, Han G, Wohn C, Lu J et al. Genome-wide expression profiling of five mouse models identifies similarities and differences with human psoriasis. *PLoS One.* 2011; 6 (4): e18266. PubMed PMID: 21483750.
 21. Zhang X, Jin JY, Wu J, Qin X, Streilein R, Hall RP et al. RNA-Seq and ChIP-Seq reveal SQSTM1/p62 as a key mediator of JunB suppression of NF- κ B-dependent inflammation. *J Invest Dermatol.* 2015; 135 (4): 1016–24. PubMed PMID: 25501661.
 22. Matsui T, Amagai M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol.* 2015; 27 (6): 269–80. PubMed PMID: 25813515.
 23. Rao KS, Babu KK, Gupta PD. Keratins and skin disorders. *Cell Biol Int.* 1996; 20 (4): 261–74. PubMed PMID: 8664850.
 24. Al Robae AA. Molecular genetics of Psoriasis (Principles, technology, gene location, genetic polymorphism and gene expression). *Int J Health Sci (Qassim).* 2010; 4 (2): 103–27.
 25. Iizuka H, Takahashi H, Honma M, Ishida-Yamamoto A. Unique keratinization process in psoriasis: late differentiation markers are abolished because of the premature cell death. *J Dermatol.* 2004; 31 (4) 271–6.

ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ: БЕЗ CRISPR/CAS9 НЕ ОБОЙТИСЬ?

И. В. Чичерин¹, С. А. Левицкий¹, И. А. Крашенинников¹, И. Тарасов², П. А. Каменский^{1,3} ✉

¹Биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

²Лаборатория молекулярной генетики, геномики и микробиологии, Страсбургский университет, Страсбург, Франция

³Институт живых систем, Балтийский федеральный университет имени И. Канта, Калининград

Мутации в митохондриальном геноме являются причиной серьезных наследственных заболеваний человека. На сегодняшний день существует несколько способов их коррекции, которые, однако, вряд ли могут быть повсеместно внедрены в клиническую практику. С другой стороны, в последние годы крайне активно развивается технология редактирования геномов CRISPR/Cas9. В работе приводится обзор существующих способов борьбы с митохондриальными мутациями, показываются основные их недостатки. Также анализируются возможности создания версии технологии CRISPR/Cas9 для коррекции мутаций в митохондриальной ДНК, обсуждаются основные этапы, которые необходимо пройти для этого. Особое внимание уделяется техническим сложностям, которые могут возникать при создании такой технологии. В целом принципиальных препятствий к разработке системы mitoCRISPR/Cas9 не выявлено.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, митохондриальные болезни, генная терапия, редактирование геномов, CRISPR/Cas9

Финансирование: Российский научный фонд, грант № 14-50-00029 (МГУ имени М. В. Ломоносова); Программа 5–100 Министерства образования и науки РФ (БФУ им. И. Канта); Международная ассоциированная лаборатория RNA-mitocure (МГУ им. М. В. Ломоносова и Страсбургский университет).

✉ **Для корреспонденции:** Каменский Петр Андреевич
Ленинские горы, д. 1, стр.12, г. Москва, 119991 (биологический факультет); peter@protein.bio.msu.ru

Статья получена: 20.06.2017 **Статья принята к печати:** 23.06.2017

THE PROSPECTS OF GENE THERAPY FOR MITOCHONDRIAL DISEASES: CAN'T WE DO WITHOUT CRISPR/CAS9?

Chicherin I¹, Levitsky SA¹, Krasheninnikov IA¹, Tarassov I², Kamenski P^{1,3} ✉

¹Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

²Laboratory of Molecular Genetics, Genomics and Microbiology, University of Strasbourg, Strasbourg, France

³Institute of Living Systems, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Mitochondrial DNA mutations cause severe inherited disorders in humans. To date, there are a few therapeutic strategies for their correction; however, it is highly unlikely that they would be routinely used in clinical practice. The past few years have witnessed the rapid progress of a genome editing technology known as CRISPR/Cas9. The present review focuses on the current strategies to combat mitochondrial mutations and reveals their major drawbacks. The article also explores the possibility of creating a possible specific CRISPR/Cas9 tool for correcting mitochondrial DNA mutations and provides a rough description of its mechanism of action. A particular focus is paid to technical challenges. On the whole, we see no principal barriers to implementing a mitoCRISPR/Cas9 system for treating mitochondrial disorders.

Keywords: mitochondrial DNA, mitochondrial diseases, gene therapy, genome editing, CRISPR/Cas9

Funding: Russian Science Foundation, grant No. 14-50-00029 (Lomonosov Moscow State University); *Project 5–100* of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Immanuel Kant Baltic Federal University); the International Associated Laboratory *RNA-mitocure* (Lomonosov Moscow State University and the University of Strasbourg).

✉ **Correspondence should be addressed:** Peter Kamenski
Leninskie Gory, d. 1, str. 12, Moscow, Russia, 119991 (Faculty of Biology); peter@protein.bio.msu.ru

Received: 20.06.2017 **Accepted:** 23.06.2017

Митохондриальный геном человека представляет собой двуцепочечную молекулу ДНК размером около 16,5 тыс. пар нуклеотидов, кодирующую 13 белков, 22 тРНК и 2 рРНК [1]. Мутации в митохондриальной ДНК встречаются в общечеловеческой популяции с частотой около 1 : 3500 [2]. Следует отметить, что далеко не всегда такие мутации,

даже если они расположены в кодирующих участках митохондриальной ДНК, приводят к развитию заболевания. В первую очередь это связано с феноменом гетероплазмии — одновременным присутствием в клетке мутантных и немутантных молекул ДНК [3]. Фенотипическое проявление мутации всегда зависит от уровня гетероплазмии, то

есть от соотношения количеств нормальных и мутантных молекул митохондриального генома. Если заболевание, вызванное мутацией в митохондриальной ДНК, все же проявляется, то чаще всего оно относится к нейромышечным болезням: именно в нервной и мышечной тканях, требующих большого количества АТФ, функция митохондрий наиболее важна для клеток.

На сегодняшний день митохондриальные болезни неизлечимы. Пациенты получают лишь симптоматическое лечение, которое обычно незначительно улучшает качество их жизни. В течение почти двух десятилетий разрабатываются различные генно-терапевтические подходы к супрессии мутаций в митохондриальном геноме [4]. Не останавливаясь на них подробно, перечислим их основные типы:

- аллотопическая экспрессия (экспрессия гена митохондриального белка в цитоплазме с последующим импортом такого белка в митохондрии и его включением в митохондриальные процессы вместо мутантного),

- ксенотопическая экспрессия (экспрессия в цитоплазме гена, ортологичного митохондриальному, из другого организма, с последующим импортом такого белка в митохондрии и его включением в митохондриальные процессы вместо мутантного),

- трансфекция синтезированных *in vitro* митохондриальных тРНК или мРНК в клетку с их последующим импортом в митохондрии и включением в митохондриальную трансляцию вместо мутантных,

- импорт в митохондрии «векторных» нуклеиновых кислот, несущих последовательности, комплементарные участку мутации митохондриальной ДНК, связывающихся с этими участками и ингибирующих репликацию мутантных молекул,

- использование специальных везикул, специфически проникающих через митохондриальные мембраны, для доставки биологических макромолекул в митохондрии с последующим их включением в молекулярные процессы в органеллах вместо мутантных.

Все эти подходы показали свою эффективность в экспериментах на культурах клеток человека. Их общим недостатком является то, что они не элиминируют саму мутацию в митохондриальном геноме, а лишь снижают уровень гетероплазмы, что, в свою очередь, приводит к частичному или полному восстановлению митохондриальной функции. Даже если представить, что подобные подходы когда-нибудь будут внедрены в клиническую практику, то очевидно, что они не воспрепятствуют передаче мутации по наследству следующим поколениям. Использование технологий, приводящих к исправлению мутаций в митохондриальных геномах, было бы более перспективным.

Митохондриально-заместительная терапия

Пожалуй, самым эффективным способом борьбы с мутациями в митохондриальном геноме является так называемая митохондриально-заместительная терапия (MRT, от англ. Mitochondrial Replacement Therapy) [5]. Этот способ не может использоваться для лечения взрослого человека, однако дает возможность матери — носителю мутации — родить здорового ребенка без мутаций в митохондриальной ДНК. При проведении MRT производится перенос диплоидного ядра из оплодотворенной яйцеклетки в донорскую яйцеклетку, предоставленную здоровой женщиной. Из донорской яйцеклетки предварительно удаляет-

ся ядро, но сохраняются все митохондрии. Таким образом, получившаяся яйцеклетка содержит ядро с генетическим материалом родителей и митохондрии с немутантной ДНК от «второй матери». После этого яйцеклетка вносится в организм матери, и начинается нормальное внутриутробное развитие. Эта технология в настоящее время уже разрешена для применения в клиниках экстракорпорального оплодотворения в Великобритании. Ожидается, что первый «ребенок от трех родителей» появится на свет до конца 2017 г., хотя некоторые страны, в которых подобные вопросы законодательно не регулируются, уже сообщили об успешном использовании MRT на практике и о рождении здоровых детей. Митохондриально-заместительная терапия является крайне удобным и технически несложным методом, однако ее применение вызывает массу этических вопросов [6, 7]. Более того, в 2016 г. Управление по контролю продуктов и лекарственных средств США (FDA) начало процесс рассмотрения данной технологии с целью одобрения ее внедрения в практику, однако вскоре получило законодательный запрет на такое рассмотрение [8] (именно по этическим соображениям). Таким образом, повсеместное распространение MRT в настоящее время вызывает серьезные сомнения.

«Митохондриальные цинковые пальцы» и mitoTALEN

Также было создано несколько систем коррекции мутаций в митохондриальной ДНК на основе молекулярных технологий редактирования генома. Такие системы ассоциированы с гораздо меньшим количеством этических проблем, чем технологии MRT. Была показана возможность сиквенс-специфического внесения двуцепочечных разрывов в мутантные молекулы митохондриальной ДНК при помощи эндонуклеаз рестрикции [9], эндонуклеаз типа «цинковые пальцы» [10] и системы TALEN [11]. Во всех этих случаях внесение разрывов сопровождалось значительным снижением уровня гетероплазмы митохондриальной ДНК, что указывает на деградацию линейризованных молекул. Более того, в случае использования системы mitoTALEN удалось достичь практически количественной селективной элиминации мутантной митохондриальной ДНК.

Эти подходы потенциально могли бы решить проблему митохондриальных болезней человека. Тем не менее они также не лишены недостатков. При использовании эндонуклеаз рестрикции требуется, чтобы мутация в митохондриальной ДНК приводила к формированию уникального сайта рестрикции, а такому условию из всех известных на сегодня патогенных мутаций удовлетворяет лишь одна. Эндонуклеазы типа «цинковые пальцы» и система TALEN более универсальны, поскольку позволяют осуществлять избирательное связывание и расщепление любых участков ДНК при помощи конструирования специфических белковых последовательностей. Однако именно это и является их основным недостатком: для каждой мутации требуется отдельно проводить дизайн и биосинтез ДНК-связывающих белковых компонентов данных систем. Также нужно отметить, что даже если в случае некоторых конкретных мутаций подобные подходы оказались эффективными, это еще не значит, что их удастся с той же эффективностью использовать для остальных мутаций, поскольку хорошо известно, что успешная работа как «цинковых пальцев», так и TALEN в значительной степени зависит от целевой последовательности ДНК. Помимо этого,

показано, что использование обеих технологий сопровождается неспецифическими эффектами в отношении митохондриальной ДНК, что приводит к значительному уменьшению количества ее немутантных копий в клетке [10]. Наконец, использование как «цинковых пальцев», так и TALEN требует экспериментальной оптимизации компонентов систем — подбора оптимальных белковых последовательностей, что является достаточно трудоемкой, длительной и дорогостоящей процедурой.

Технология CRISPR/Cas9

Итак, можно утверждать, что на сегодняшний день отсутствуют способы коррекции мутаций в митохондриальной ДНК, которые были бы одновременно эффективными, технически несложными, дешевыми и не вызывали бы этических проблем. Однако всем этим критериям удовлетворяет система CRISPR/Cas9.

По механизму своей работы она напоминает систему TALEN и состоит из гидовых РНК CRISPR, связывающихся с целевыми участками ДНК по принципу комплементарности, и эндонуклеазы Cas9, осуществляющей двуцепочечный разрыв цепочки ДНК в месте связывания гидовых РНК. Данная система в живой природе существует у бактерий и используется ими для защиты от бактериофагов. В 2013 г. была впервые показана возможность использования технологии CRISPR/Cas9 для избирательного разрезания ДНК человека в живой клетке [12]. Это стало толчком для взрывообразного развития генно-терапевтических приложений технологии. Так, в 2015 г. при помощи технологии CRISPR/Cas9 была проведена коррекция мутаций в эмбрионах человека [13]. Также оказалось, что CRISPR/Cas9 может быть невероятно эффективной и в сельском хозяйстве: с помощью этой технологии уже получено множество новых сортов растений, некоторые из которых одобрены для сельскохозяйственного использования в отдельных странах [14]. В области редактирования геномов животных также достигнуты определенные успехи (например, были созданы породы коров, устойчивых к туберкулезу [15], но к настоящему времени соответствующие продукты еще не выведены на рынки.

Широчайшее распространение технологии CRISPR/Cas9 объясняется в основном тем, что в качестве компонентов системы, обеспечивающих ее целевое воздействие на геном, используются короткие РНК. Это делает применение технологии CRISPR/Cas9 гораздо более простым и дешевым по сравнению с технологиями «цинковых пальцев» и TALEN, в случае которых требуется каждый раз проводить дизайн и синтез больших белковых молекул. «Слабым местом» системы CRISPR/Cas9 является так называемый эффект off-target: зачастую разрезание геномной ДНК происходит не только в целевом участке, но и в нескольких других, близких по последовательности к целевому. Это практически никогда не приводит к дополнительному изменению фенотипа, однако недостаточно высокая специфичность технологии в любом случае является серьезной проблемой, на решение которой направлены усилия множества научных групп по всему миру.

В настоящее время несколько лабораторий занимаются разработкой версии системы CRISPR/Cas9 для редактирования митохондриальной ДНК. Такая система могла бы стать оптимальным способом борьбы с патогенными мутациями в митохондриальном геноме. Во-первых, редактирование эмбрионов человека посредством такой

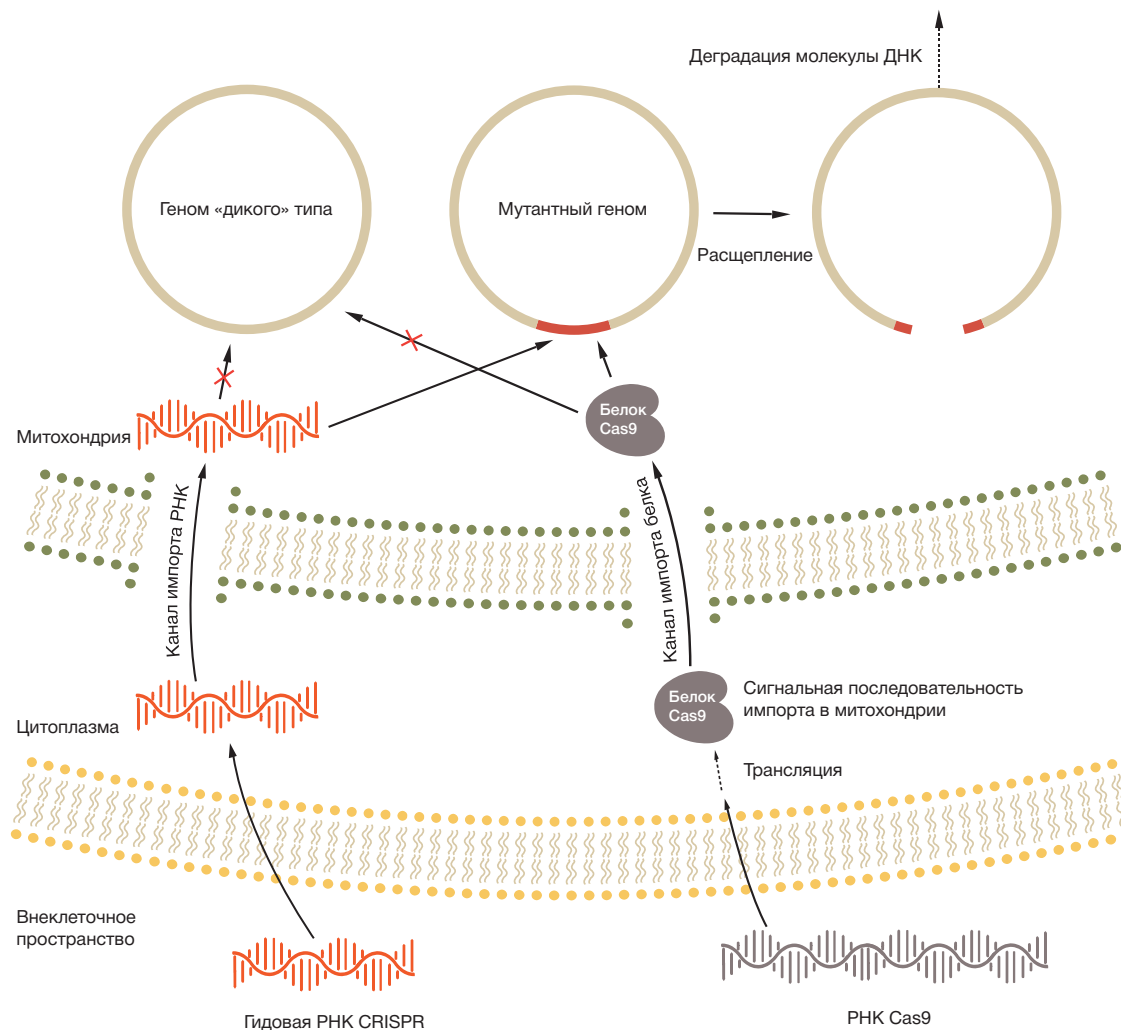
системы может решить проблему передачи митохондриальных мутаций по наследству. Во-вторых, с использованием систем адресной доставки в различные органы и ткани такая система может серьезно улучшить качество жизни взрослых людей, страдающих от митохондриальных заболеваний. Наконец, в-третьих, как уже отмечалось выше, такая система вызывает существенно меньше этических вопросов, чем технология MRT. Однако на сегодняшний день общепризнанной технологии mitoCRISPR/Cas9 не существует. Нужно отметить, что одна работа с описанием подобной системы все-таки имеется, однако достоверность ее результатов подвергается серьезному сомнению научным сообществом.

Как создать систему mitoCRISPR/Cas9?

Рассмотрим основные этапы, которые, по нашему мнению, необходимо пройти для создания митохондриальной версии системы CRISPR/Cas9 (рисунок). Мы не претендуем на абсолютную полноту и правильность данного списка, но отмечаем, что подобного систематического анализа в научной литературе до сегодняшнего дня не имелось.

1. *Направление нуклеазы Cas9 в митохондрии.* В любой эукариотической клетке, в том числе и в клетке человека, функционирует прекрасно изученный аппарат импорта белков в митохондрии [16]. Большинство импортируемых белков содержит на N-концах специальные сигнальные последовательности длиной несколько десятков аминокислот, наличие которых обычно является необходимым и достаточным условием импорта. Добавление на N-конец неимпортируемого цитоплазматического белка такой сигнальной последовательности приводит к тому, что такой гибридный белок начинает импортироваться в митохондрии и обычно проявляет функциональную активность в органеллах; при этом сигнальная последовательность отщепляется митохондриальными протеазами. Никаких препятствий к осуществлению аналогичной процедуры с белком Cas9 нет. Более того, в научной литературе уже имеется описание версии Cas9, импортирующейся в митохондрии клеток человека [17]. Нужно отметить, что в случае митохондрий вполне может быть использован способ доставки Cas9, считающийся в настоящее время оптимальным, а именно: доставка мРНК Cas9 в клетку с ее последующей трансляцией цитоплазматическими рибосомами. Если доставляемая мРНК будет кодировать митохондриальную сигнальную последовательность, то синтезируемый белок будет направляться из цитоплазмы в митохондрии.

2. *Импорт гидовых РНК CRISPR в митохондрии и их связывание с мутантными молекулами митохондриальной ДНК.* Импорт РНК в митохондрии — процесс, также известный в живой природе [18]. Описаны нуклеотидные последовательности и структурные мотивы молекул РНК, опять-таки являющиеся необходимым и достаточным условием их импорта в митохондрии клеток человека [19, 20]. Помимо этого, показано, что химерные РНК, состоящие из данных структурных мотивов и других последовательностей, эффективно импортируются в митохондрии и даже связываются с митохондриальной ДНК по принципу комплементарности [21]. Более того, такое связывание может происходить селективным образом только с мутантной ДНК, причем импортируемые РНК способны дискриминировать даже точечные мутации в митохондриальном геноме, практически не связываясь при этом



Возможный механизм работы системы mitoCRISPR/Cas9

с нормальными молекулами ДНК органелл [22]. Таким образом, существует экспериментально показанная возможность транспорта РНК CRISPR (в составе химерных молекул РНК) в митохондрии и их избирательного связывания с участками мутаций в митохондриальном геноме.

3. *Предотвращение попадания компонентов системы CRISPR/Cas9 в ядро.* Гидовые РНК CRISPR, предназначенные для работы в митохондриях, теоретически могут оказаться в ядре после трансфекции клеток и даже связаться там с какими-либо участками генома. Однако это не должно приводить к негативным последствиям, поскольку митохондриальная версия Cas9 в ядре оказаться не может: она не содержит в своем составе сигнальной последовательности на импорт в ядро, без чего транспорт белков в ядро невозможен. Впрочем, контроль присутствия этих макромолекул в ядре при разработке митохондриальной версии системы CRISPR/Cas9 обязательно должен проводиться.

4. *Разрезание мутантных молекул ДНК в митохондриях.* На первый взгляд, данный этап не должен вызывать сколько-нибудь серьезных проблем. Если все компоненты системы окажутся в органеллах, разрезание должно произойти с очень высокой вероятностью, подобно тому, как это происходит при работе системы CRISPR/Cas9 в ядре. Более того, такое разрезание уже показано в случае технологии mitoTALEN (см. выше). Однако не стоит забывать,

что митохондриальная ДНК существует в виде достаточно плотно упакованного ДНК-белкового комплекса, называемого нуклеоидом [23], причем плотность его упаковки, по некоторым данным, превышает таковую в случае ядерной ДНК. Соответственно, можно предположить, что это может помешать разрезанию ДНК нуклеазой Cas9. Впрочем, это все же маловероятно, поскольку (1) система mitoTALEN не испытывает серьезных затруднений в аналогичной ситуации и (2) плотная упаковка митохондриальной ДНК не препятствует связыванию с ней малых РНК (см. выше), а значит, не должна препятствовать и работе нуклеазы.

5. *Преодоление эффекта off-target.* Напомним, что данный эффект в основном вызывается связыванием гидовых РНК CRISPR с нецелевыми участками генома, схожими по последовательности с целевым участком. Вряд ли это возможно в случае митохондриального генома человека, который имеет всего 16,5 тыс. пар нуклеотидов в длину. При использовании гидовых РНК стандартного размера (около 20 нуклеотидов) нецелевое связывание должно происходить с гораздо меньшей частотой, чем при манипуляциях с ядерным геномом, и даже если часть немутантных молекул митохондриальной ДНК окажется разрезанными и будут элиминированы, это не должно существенно сказаться на функции клетки. Впрочем, эффект off-target должен тщательно контролироваться при разработке системы mitoCRISPR/Cas9.

6. Элиминация линейризованных мутантных молекул митохондриальной ДНК. На данном финальном этапе работы гипотетической системы mitoCRISPR/Cas9, казалось бы, также не должно возникать серьезных затруднений, тем более что подобная элиминация была продемонстрирована при работе системы mitoTALEN (см. выше). Более того, при направленном внесении в митохондриальную ДНК двуцепочечных разрывов факта их репарации обнаружено не было; вместо этого происходила именно элиминация линейризованной ДНК [24]. Теоретически в случае образования в молекуле митохондриальной ДНК двуцепочечного разрыва может также происходить рекомбинация с участием неразрезанных молекул. Однако прямого доказательства существования процессов рекомбинации в митохондриях клеток человека до сих пор не имеется. Тем не менее не стоит забывать о такой возможности. После воздействия нуклеазы Cas9 гидовые РНК CRISPR должны некоторое время оставаться связанными с участками ДНК

в непосредственной близости от разрыва. Это может приводить к временной стабилизации линейризованной ДНК и, как следствие, к увеличению вероятности рекомбинационной репарации разрыва. Теоретически возможно, что для эффективной работы системы mitoCRISPR/Cas9 необходимо будет временно ингибировать системы рекомбинации и репарации в органеллах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опираясь на текущий уровень знаний о молекулярной биологии митохондрий и уровень развития технологии CRISPR/Cas9, можно заключить, что непреодолимых препятствий на пути к созданию митохондриальной версии этой технологии нет. Мы надеемся, что система mitoCRISPR/Cas9 будет создана в недалеком будущем и по праву займет лидирующее место в ряду современных подходов к супрессии мутаций в митохондриальной ДНК.

Литература

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981 Apr 9; 290 (5806): 457–65.
- Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders — past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Dec 6; 1659 (2–3): 115–20.
- Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*. 2005 May; 6 (5): 389–402.
- Patrushev MV, Kamenski PA, Mazunin IO. Mutations in mitochondrial DNA and approaches for their correction. *Biochemistry (Mosc)*. 2014 Nov; 79 (11): 1151–60. DOI: 10.1134/S0006297914110029.
- Wolf DP, Mitalipov N, Mitalipov S. Mitochondrial replacement therapy in reproductive medicine. *Trends Mol Med*. 2015 Feb; 21 (2): 68–76. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.12.001.
- Rulli T. The Mitochondrial Replacement 'Therapy' Myth. *Bioethics*. 2017 Jun; 31 (5): 368–74. DOI: 10.1111/bioe.12332.
- Burrell C. Mitochondrial replacement therapy and 'three-parent children' — who should be registered as the legal parents? *BJOG*. 2017 Jun; 124 (7): 1056. DOI: 10.1111/1471-0528.14638.
- Adashi EY, Cohen IG. Mitochondrial Replacement Therapy: Unmade in the USA. *JAMA*. 2017 Feb 14; 317 (6): 574–5. DOI: 10.1001/jama.2016.20935.
- Tanaka M, Borgeld HJ, Zhang J, Muramatsu S, Gong JS, Yoneda M et al. Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease Smal into mitochondria. *J Biomed Sci*. 2002; 9 (6 Pt 1): 534–41.
- Gammage PA, Gaude E, Van Haute L, Rebelo-Guiomar P, Jackson CB, Rorbach J et al. Near-complete elimination of mutant mtDNA by iterative or dynamic dose-controlled treatment with mtZFNs. *Nucleic Acids Res*. 2016 Sep 19; 44 (16): 7804–16. DOI: 10.1093/nar/gkw676.
- Bacman SR, Williams SL, Pinto M, Peralta S, Moraes CT. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat Med*. 2013 Sep; 19 (9): 1111–3. DOI: 10.1038/nm.3261.
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014 Nov 28; 346 (6213): 1258096. DOI: 10.1126/science.1258096.
- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell*. 2015 May; 6 (5): 363–72. DOI: 10.1007/s13238-015-0153-5.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Patron NJ, Nekrasov V. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotechnol*. 2015 Apr; 32: 76–84. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.11.007.
- Gao Y, Wu H, Wang Y, Liu X, Chen L, Li Q et al. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biol*. 2017 Feb 1; 18 (1): 13. DOI: 10.1186/s13059-016-1144-4.
- Straub SP, Stiller SB, Wiedemann N, Pfanner N. Dynamic organization of the mitochondrial protein import machinery. *Biol Chem*. 2016 Nov 1; 397 (11): 1097–114. DOI: 10.1515/hsz-2016-0145.
- Orishchenko KE, Sofronova JK, Chupakhin EG, Lunev EA, Mazunin IO. Delivery Cas9 into mitochondria. *Genes and Cells*. 2016; 11: 100–5.
- Sieber F, Duchene AM, Marechal-Drouard L. Mitochondrial RNA import: from diversity of natural mechanisms to potential applications. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011; 287: 145–90. DOI: 10.1016/B978-0-12-386043-9.00004-9.
- Wang G, Shimada E, Zhang J, Hong JS, Smith GM, Teitell MA et al. Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Mar 27; 109 (13): 4840–5. DOI: 10.1073/pnas.1116792109.
- Kolesnikova O, Kazakova H, Comte C, Steinberg S, Kamenski P, Martin RP et al. Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria. *RNA*. 2010 May; 16 (5): 926–41. DOI: 10.1261/rna.1914110.
- Comte C, Tonin Y, Heckel-Mager AM, Boucheham A, Smirnov A, Aure K et al. Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan 7; 41 (1): 418–33. DOI: 10.1093/nar/gks965.
- Tonin Y, Heckel AM, Vysokikh M, Dovvydenko I, Meschaninova M, Rotig A et al. Modeling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed RNA targeting a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *J Biol Chem*. 2014 May 9; 289 (19): 13323–34. DOI: 10.1074/jbc.M113.528968.
- Kolesnikov AA. The Mitochondrial Genome. *The Nucleoid, Biochemistry (Mosc)*. 2016; 81 (2): 1057–65.
- Moretton A, Morel F, Macao B, Lachaux P, Ishak L, Lefebvre M et al. Selective mitochondrial DNA degradation following double-strand breaks. *PLoS One*. 2017 Apr 28; 12 (4): e0176795. DOI: 10.1371/journal.pone.0176795.

References

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981 Apr 9; 290 (5806): 457–65.
- Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders — past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Dec 6; 1659 (2–3): 115–20.
- Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*. 2005 May; 6 (5): 389–402.
- Patrushev MV, Kamenski PA, Mazunin IO. Mutations in mitochondrial DNA and approaches for their correction. *Biochemistry (Mosc)*. 2014 Nov; 79 (11): 1151–60. DOI: 10.1134/S00062979141110029.
- Wolf DP, Mitalipov N, Mitalipov S. Mitochondrial replacement therapy in reproductive medicine. *Trends Mol Med*. 2015 Feb; 21 (2): 68–76. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.12.001.
- Rulli T. The Mitochondrial Replacement 'Therapy' Myth. *Bioethics*. 2017 Jun; 31 (5): 368–74. DOI: 10.1111/bioe.12332.
- Burrell C. Mitochondrial replacement therapy and 'three-parent children' — who should be registered as the legal parents? *BJOG*. 2017 Jun; 124 (7): 1056. DOI: 10.1111/1471-0528.14638.
- Adashi EY, Cohen IG. Mitochondrial Replacement Therapy: Unmade in the USA. *JAMA*. 2017 Feb 14; 317 (6): 574–5. DOI: 10.1001/jama.2016.20935.
- Tanaka M, Borgeld HJ, Zhang J, Muramatsu S, Gong JS, Yoneda M et al. Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease Smal into mitochondria. *J Biomed Sci*. 2002; 9 (6 Pt 1): 534–41.
- Gammage PA, Gaude E, Van Haute L, Rebelo-Guiomar P, Jackson CB, Rorbach J, et al. Near-complete elimination of mutant mtDNA by iterative or dynamic dose-controlled treatment with mtZFNs. *Nucleic Acids Res*. 2016 Sep 19; 44 (16): 7804–16. DOI: 10.1093/nar/gkw676.
- Bacman SR, Williams SL, Pinto M, Peralta S, Moraes CT. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat Med*. 2013 Sep; 19 (9): 1111–3. DOI: 10.1038/nm.3261.
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014 Nov 28; 346 (6213): 1258096. DOI: 10.1126/science.1258096.
- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015 May; 6 (5): 363–72. DOI: 10.1007/s13238-015-0153-5.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Patron NJ, Nekrasov V. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotechnol*. 2015 Apr; 32: 76–84. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.11.007.
- Gao Y, Wu H, Wang Y, Liu X, Chen L, Li Q et al. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biol*. 2017 Feb 1; 18 (1): 13. DOI: 10.1186/s13059-016-1144-4.
- Straub SP, Stiller SB, Wiedemann N, Pfanner N. Dynamic organization of the mitochondrial protein import machinery. *Biol Chem*. 2016 Nov 1; 397 (11): 1097–114. DOI: 10.1515/hsz-2016-0145.
- Orishchenko KE, Sofronova JK, Chupakhin EG, Lunev EA, Mazunin IO. Delivery Cas9 into mitochondria. *Genes and Cells*. 2016; 11: 100–5.
- Sieber F, Duchene AM, Marechal-Drouard L. Mitochondrial RNA import: from diversity of natural mechanisms to potential applications. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011; 287: 145–90. DOI: 10.1016/B978-0-12-386043-9.00004-9.
- Wang G, Shimada E, Zhang J, Hong JS, Smith GM, Teitell MA et al. Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Mar 27; 109 (13): 4840–5. DOI: 10.1073/pnas.1116792109.
- Kolesnikova O, Kazakova H, Comte C, Steinberg S, Kamenski P, Martin RP et al. Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria. *RNA*. 2010 May; 16 (5): 926–41. DOI: 10.1261/rna.1914110.
- Comte C, Tonin Y, Heckel-Mager AM, Boucheham A, Smirnov A, Aure K, et al. Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan 7; 41 (1): 418–33. DOI: 10.1093/nar/gks965.
- Tonin Y, Heckel AM, Vysokikh M, Dovydenko I, Meschaninova M, Rotig A, et al. Modeling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed RNA targeting a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *J Biol Chem*. 2014 May 9; 289 (19): 13323–34. DOI: 10.1074/jbc.M113.528968.
- Kolesnikov AA. The Mitochondrial Genome. *The Nucleoid, Biochemistry (Mosc)*. 2016; 81 (2): 1057–65.
- Moretton A, Morel F, Macao B, Lachaume P, Ishak L, Lefebvre M et al. Selective mitochondrial DNA degradation following double-strand breaks. *PLoS One*. 2017 Apr 28; 12 (4): e0176795. DOI: 10.1371/journal.pone.0176795.

ВЛИЯНИЕ ВЫБОРА ЧИСЛА ПОКРЫТИЙ ПРИ СЕКВЕНИРОВАНИИ НА ТОЧНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЕДИНИЧНЫХ НУКЛЕОТИДНЫХ ВАРИАНТОВ

Д. И. Борисевич, А. Ю. Красненко, И. Ф. Стеценко, Д. А. Плахина, В. В. Ильинский ✉

ООО «Генотек», Москва

В настоящее время технология секвенирования нового поколения (NGS) широко применяется в клинической практике. Однако до сих пор стоимость одного исследования с использованием технологии NGS остается достаточно высокой, что ограничивает широкое применение данного метода. Одним из факторов, влияющих на стоимость, является выбор числа покрытий при секвенировании, то есть количество раз, которое был отсеквенирован каждый нуклеотид. С одной стороны, уменьшение числа покрытий значительно снижает стоимость и время, затрачиваемое на исследования, с другой стороны, при уменьшении данного показателя снижается качество получаемых результатов. До сих пор не существует однозначного мнения, какое минимальное число покрытий достаточно для получения достоверного результата. Целью данного исследования было определить минимальное число покрытий, достаточное для корректного определения гетерозигот и единичных нуклеотидных вариантов (SNV). В представленной работе, используя различные биоинформатические методы, было показано, что минимальное число покрытий соответствует 12X.

Ключевые слова: секвенирование нового поколения (NGS), число покрытий, мутация, рид, SNP, SNV

Благодарности: авторы благодарят Анну Давыдову из «Генотек» за помощь в написании статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Ильинский Валерий Владимирович
Наставнический пер., д. 17, стр. 1, г. Москва, 105120; valery@genotek.ru

Статья получена: 22.06.2017 **Статья принята к печати:** 27.06.2017

THE IMPACT OF SEQUENCING DEPTH ON ACCURACY OF SINGLE NUCLEOTIDE VARIANT CALLS

Borisevich DI, Krasnenko AYU, Stetsenko IF, Plakhina DA, Ilinsky VV ✉

Genotek, Moscow, Russia

Today, next generation sequencing (NGS) is extensively used in the research setting. However, high costs of NGS testing still prevent its routine use in clinical practice. One of the factors affecting the cost of sequencing is the number of reads per site, i.e. the number of times each nucleotide gets sequenced. On the one hand, lower coverage makes the whole process much faster and less time-consuming. On the other hand, it results in poor data quality. No unanimous opinion has been reached yet as to what minimum depth of coverage can produce reliable results. The aim of this study was to determine the minimum number of reads sufficient for accurate base calling of heterozygous and single nucleotide variants (SNV). Using bioinformatics methods, we demonstrate that accuracy can be achieved at a minimum depth of 12X.

Keywords: Next-generation sequencing (NGS), sequencing depth, mutation, read, SNP, SNV

Acknowledgements: authors thank Anna Davydova of Genotek for her helpful comments.

✉ **Correspondence should be addressed:** Valery Ilinsky
per. Nastavnichesky, d. 17, str. 1, Moscow, Russia, 105120; valery@genotek.ru

Received: 22.06.2017 **Accepted:** 27.06.2017

Участки генома, кодирующие белки, составляют лишь 1 % всего человеческого генома, но именно в них сосредоточены 85 % мутаций, определяющих возникновение и развитие различных заболеваний [1]. В связи с этим экзомное секвенирование, а также секвенирование с использованием специально разработанных панелей для обогащения, фокусирующихся на тех участках экзонов, в которых могут быть обнаружены значимые мутации, нашли наибольшее применение в клинической практике [2].

Один из важнейших вопросов клинического использования экзомного секвенирования — выбор адекватного числа покрытий (количество раз, которое был отсеквенирован каждый нуклеотид; обычно обозначается как 10x, 20x, 50x и т. д.) [3]. Именно оно позволяет выявить возмож-

ные ошибки считывания нуклеотидов на машине и определить истинные позиции в геноме. При этом мы сталкиваемся с двумя разнонаправленными факторами, влияющими на определение количества покрытий. Первый фактор — это время и стоимость секвенирования, которые увеличиваются с ростом числа покрытий. Второй фактор — статистический: какое минимальное количество покрытий позволяет свести до уровня допустимой погрешности ошибку при выявлении мутаций, причем по этому фактору не существует единого мнения. С чем это связано?

Используя технологию коротких прочтений Illumina, Bentley и соавт. в 2008 г. определили, что почти все единичные нуклеотидные варианты (SNV) в гомозиготе обнаруживаются при покрытии 15x, тогда как для обнаружения

SNV в гетерозиготе необходимо покрытие 33x [4]. Основываясь на полученных данных, в большинстве последующих работ, связанных с обнаружением SNV, авторы использовали значение покрытия 33x в качестве стандартного [5, 6]. В 2011 г. Aja и соавт. опубликовали статью, в которой показали, что для определения 95 % SNV, а также коротких инсерций и делеций необходимо устанавливать покрытие 50x. Однако последующие эксперименты с использованием усовершенствованных реагентов и программного обеспечения для обработки данных позволили авторам получить такой же результат, снизив значение покрытия до 35x [7]. В 2014 г. вышла статья Fang и соавт., в которой было найдено, что для обнаружения 95 % вставок и делеций необходимо устанавливать покрытие 60x [8].

Разброс в числе покрытий, представленный выше, показывает, что говорить об универсальности этого значения в настоящее время становится все сложнее, поскольку количество прочтений одного и того же участка для обнаружения вариантов напрямую зависит от качества прочтения этого участка. На качество прочтения влияет не только технология секвенирования, используемые реагенты, но также и подготовка образца. Например, трудности амплификации GC-богатых участков при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) приводят к ухудшению качества прочтения и, как следствие, к необходимости увеличения числа покрытий. В настоящее время существует химия для ПЦР, позволяющая улучшить качество реакции и тем самым дальнейшее качество прочтения при секвенировании. В 2013 г. Meunert и соавт. определили, что для обнаружения 95 % SNP требуется покрытие от 20x до 46x в зависимости от используемой химии [9]. Этими же авторами в 2014 г. было обнаружено, что для детекции 95 % SNP достаточной глубиной покрытия является 14 ридов [10]. Кроме того, Li и соавт. показали, что глубина покрытия также зависит и от количества индивидуальных образцов, используемых при секвенировании [11]. Так, при обнаружении мутации, встречающейся с частотой менее 0,2 %, секвенирование 3 000 индивидуальных образцов с покрытием 4x дает аналогичный результат, что и секвенирование менее 2 000 индивидуальных образцов при покрытии 30x. Таким образом, мы видим, что факторов больше, чем кажется на первый взгляд, и количество покрытий может быть эффективно уменьшено за счет ряда деталей при проведении исследования и исходя из его конкретных целей.

В представленной работе показано, что при использовании панели для обогащения Genotek01 минимальное покрытие, достаточное для корректного определения гетерозигот и SNV, соответствует 12x, при этом расхождение результатов секвенирования и результатов валидирования по методу Сэнгера составляет 0,5 %.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ДНК, приготовление и секвенирование ДНК-библиотек

ДНК выделялась из цельной венозной крови, полученной от пациентов, страдающих наследственными заболеваниями, с помощью набора QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия). Контроль качества геномной ДНК проводили с помощью агарозного гель-электрофореза. Важным показателем было отсутствие деградации ДНК и загрязнения РНК. Измерение концентрации выделенной ДНК проводили на приборе Qubit 3.0 Fluorometer (Life Technologies,

США). ДНК-библиотеки готовили с помощью набора NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, США) с использованием адаптеров для секвенирования на платформе Illumina, согласно протоколу производителя. Двойное баркодирование выполнялось с помощью ПЦР с набором NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers Set 1) той же фирмы. Контроль качества полученных библиотек фрагментов ДНК был проведен с помощью Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США). Для таргетного обогащения кодирующих регионов генома использовался набор MYbaits (MYcroarray, США). Секвенирование проводилось на геномном анализаторе HiSeq 2500 System (Illumina, США) методом парных прочтений длиной 100 нуклеотидов с использованием наборов HiSeq Rapid PE Cluster Kit v2 и HiSeq Rapid SBS Kit v2 (Illumina) по протоколу производителя.

Секвенирование по Сэнгеру

Для проведения процедуры мечения ампликонов флуоресцентными метками использовали наборы BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя. Секвенирование по Сэнгеру проводилось на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) по протоколу производителя.

Биоинформатический анализ

Полученные чтения выравнивали на референсный геном *hg19* с помощью программы BWA. Дедупликацию ридов выполняли командой `rmdup` в SAMtools, коллинг (variant calling) осуществляли с помощью пакета GATK (Genome Analysis ToolKit). Было обнаружено 89 мутаций: 10 гомо- и гемизигот, 79 гетерозигот; 80 точечных мутаций (SNP) и 9 коротких инсерций и делеций (инделов). Были также определены генотипы в регионах в 200 нуклеотидов влево и вправо от мутации. Все позиции из регионов, проанализированных в ходе анализа секвенирования, были валидированы с использованием секвенирования по Сэнгеру, которое считается золотым стандартом для детекции коротких мутаций. Хроматограммы были обработаны единообразно. Коллинг мутаций из хроматограмм был осуществлен с помощью собственного ПО, разработанного «Генотек» на основе BioPython и пакетов R: `sangerseqR`, `seqinr`, `Biostrings` и `Rsubread`. Нами было проведено сравнение генотипов, полученных методом высокопроизводительного секвенирования (NGS), с результатами секвенирования по Сэнгеру и рассчитаны чувствительность и специфичность.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Валидация мутаций секвенированием по Сэнгеру

Секвенированием по Сэнгеру не были подтверждены 15 из 89 обнаруженных с помощью коллинга мутаций, т. е. они или имели другой генотип, чем был определен секвенированием, или отсутствовали. При этом 8 из 15 неподтвержденных мутаций имели гетерозиготный генотип, в то время как валидация по Сэнгеру определила наличие гомозиготной мутации. Стоит отметить, что в данном случае гетерозигота по данным NGS была поддержана только одним ридом с референсным аллелем (на рис. 1 кластер мутаций в правом нижнем углу графика).

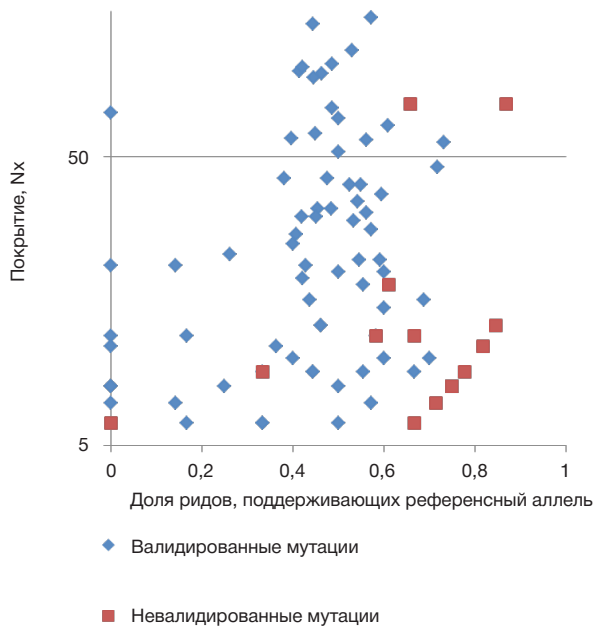


Рис. 1. Распределение валидированных и невалидированных Сэнгером мутаций по покрытию и доле ридов, поддерживающей альтернативный аллель. Одной точке может соответствовать более одной мутации

Симулирование различного покрытия

Для определения минимального порога секвенирования многократно симулировали понижение покрытия (bootstrap) для каждой из доступных мутаций и окружающего их региона, а также был проведен коллинг мутаций в таких данных. Частоту ошибок коллинга оценивали, используя позиции, которые в изучаемых образцах были подтверждены секвенированием по Сэнгеру как имеющие генотип референсных гомозигот.

Оценка качества секвенирования возможна с помощью метрики Phred quality score (Q score), выдаваемой секвенатором для каждого нуклеотида [12]. Однако данное качество является лишь оценкой точности секвенирования и

Варьирование числа и доли ридов для отсеки референсных и альтернативных гомозигот

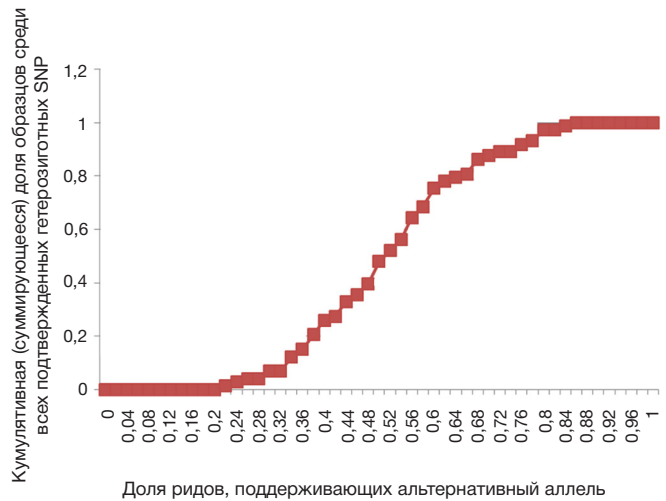


Рис. 2. Кумулятивное распределение доли образцов, имеющих долю ридов, поддерживающих альтернативный аллель X или менее

не дает надежных значений для имеющихся данных. Мы проверяли, совпадает ли каждый имеющийся рид, перекрывающий такую позицию, по генотипу с референсным, и если находили отличие, то считали это ошибкой коллинга.

Были проанализированы 372 443 нуклеотида. Из них 276 были нуклеотидами, отличающимися от референсного, а остальные совпадали с ним. Таким образом, частота ошибок составила 0,0741 %, что эквивалентно примерно Q31 по Phred quality score.

Для 69 позиций, в которых имелись подтвержденные гетерозиготные мутации, мы оценили распределение доли ридов, поддерживающих альтернативный аллель (рис. 2).

Используя полученное распределение ридов из гетерозиготы и частоту ошибок коллинга, была рассчитана частота возникновения комбинаций для различных покрытий от 2х до 50х для различного числа ридов от 0 до максимально возможного, поддерживающих альтернативный аллель. Полученные частоты применили для расчета частоты двух типов ошибок: определение гетерозиготной позиции как

Число ошибочных коллов на 12M6 библиотеке																					
мин. поддержка		покрытие ->																			
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
IV 2	IV 2	6	19	39	65	98	137	183	236	294	360	432	510	595	687	784	889	999	1116	1240	1370
	IV 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	3	3	4	5	6
	IV 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IV 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IV 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IV 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IV 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IV 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IV 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Число обнаруженных коллов 0/1 из 1000																				
Порог гетерозигот 0.9	IV 2	0	375	625	782	875	930	961	978	978	989	994	996	998	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	IV 3	0	0	250	469	640	765	851	908	934	962	978	987	993	996	998	999	999	999	1000	1000
	IV 4	0	0	0	157	328	492	633	744	817	882	924	952	970	982	989	994	996	998	999	999
	IV 5	0	0	0	0	93	219	359	498	612	721	803	865	909	941	962	975	985	990	994	996
	IV 6	0	0	0	0	0	55	141	252	366	495	610	707	787	849	895	928	952	968	979	987
	IV 7	0	0	0	0	0	0	31	88	161	269	384	498	604	696	773	834	881	916	942	961
	IV 8	0	0	0	0	0	0	0	18	44	108	191	289	394	500	598	685	760	820	868	905
	IV 9	0	0	0	0	0	0	0	0	28	70	131	211	304	402	500	593	676	748	808	
	IV 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	44	89	151	227	315	407	500	588	668	
	Порог гетерозигот 0.8	IV 2	0	375	625	626	781	875	930	960	934	962	978	986	992	983	989	994	996	998	994
IV 3		0	0	250	313	546	710	820	890	890	935	962	977	987	979	987	993	995	998	994	996
IV 4		0	0	0	1	234	437	602	726	773	855	908	942	964	965	978	988	992	996	993	995
IV 5		0	0	0	0	164	328	480	568	694	787	855	903	924	951	969	981	988	988	992	
IV 6		0	0	0	0	0	110	234	322	468	594	697	781	832	884	922	948	966	973	983	
IV 7		0	0	0	0	0	0	70	117	242	368	488	598	679	762	828	877	914	936	957	
IV 8		0	0	0	0	0	0	0	0	81	175	279	388	483	587	679	756	818	862	901	
IV 9		0	0	0	0	0	0	0	0	1	54	121	205	287	391	494	589	674	742	804	
IV 10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	83	134	216	309	403	498	582	664	
Порог гетерозигот 0.7		IV 2	0	375	375	626	781	711	821	890	817	881	924	951	909	941	961	929	951	969	942
	IV 3	0	0	0	313	546	546	711	820	773	854	908	942	904	937	959	928	950	969	942	960
	IV 4	0	0	0	0	1	234	493	656	656	774	854	907	881	923	950	923	947	967	941	959
	IV 5	0	0	0	0	0	0	219	410	451	613	733	820	820	882	923	904	936	959	936	956
	IV 6	0	0	0	0	0	0	0	1	164	205	387	540	662	698	790	856	857	903	937	947
	IV 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	161	314	453	515	637	734	763	832	885	884	921
	IV 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	121	244	305	441	559	614	711	789	810	865
	IV 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	86	122	245	363	429	544	645	690	768	
	IV 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92	188	244	358	469	530	628		
	Число обнаруженных коллов 1/1 при настоящем генотипе 0/1 на 1000																				
IV 0.9	9	6	5	4	3	3	3	2	13	11	9	8	7	6	5	5	4	4	9	8	
IV 0.8	9	6	5	90	51	32	23	17	56	42	33	26	21	47	38	32	27	24	42	37	
IV 0.7	9	6	189	90	51	178	114	78	170	125	94	73	130	104	84	134	111	93	136	116	

референсной гомозиготы; и определение гетерозиготной позиции как альтернативной гомозиготы при различных порогах отсечки референсных и альтернативных гомозигот.

Для отсеки референсных гомозигот варьировали фиксированное число ридов (от 2 до 10). Для отсеки альтернативных гомозигот варьировали долю ридов, поддерживающих альтернативный аллель, между 70, 80 и 90 % (таблица).

Установлено, что для коротких мутаций (SNP и инделов) точность метода достигает 99,7 %, чувствительность — 98 % при покрытии в точке 12x. Меньшее покрытие приводит к значительному снижению чувствительности в сигмоидном характере и поэтому не может быть рекомендовано.

Для планирования эксперимента в лаборатории важно знать, с каким средним покрытием нужно секвенировать образец, чтобы целевые регионы были покрыты на 12x. Для расчета этой величины мы построили корреляцию между средним покрытием образца и долей целевого региона, покрытого 12 ридов (рис. 3).

Было обнаружено, что для покрытия целевых регионов не менее чем на 12x на 90 % и более необходимо минимум 40x среднее покрытие дуплицированными ридов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Секвенированием по Сэнгеру не удалось подтвердить 15 из 89 мутаций, при этом 8 из 15 неподтвержденных мутаций имели гомозиготный, а не гетерозиготный генотип. Наличие данных мутаций определяется моделью ошибок GATK, программой, позволяющей получить набор вариантов в исследуемом геноме, которая во время коллинга по-разному трактует одиночные риды с неререференсным и референсным аллелями. Дело в том, что в репрограмме GATK используется модель «уверенности в референсе» (reference confidence model) в сочетании с когортным анализом [13, 14]. Поэтому в случае получения одиночного рида, совпадающего с неререференсным аллелем, GATK считает варианты нуклеотидов в данном риде ошибкой

секвенирования и не учитывает их при расчете генотипа. А в случае вариантов, найденных в одиночном риде, совпадающем с референсным аллелем, она считает ошибку маловероятной и выдает гетерозиготный (а не гомозиготный) генотип. Кроме того, большинство мутаций, которые не были подтверждены секвенированием по Сэнгеру, имели низкое покрытие (<= 10x). Полученные результаты подтверждают, что для корректного коллинга мутаций необходимо секвенирование с достаточно большим покрытием, чтобы одиночные ошибки секвенирования не искажали результаты [15].

Необходимое покрытие в точке является вероятностной величиной и может быть рассчитано с достоверной точностью. Нами было показано, что частота ошибок в результатах, получаемых с использованием HiSeq 2500 System, соответствует погрешности прибора, и рассчитано минимально необходимое покрытие в точке для практического применения — 12x. Эта величина меньше в сравнении с результатами Bentley и соавт. [4]. Данное улучшение может быть вызвано меньшим числом ошибок за счет использования усовершенствованного прибора

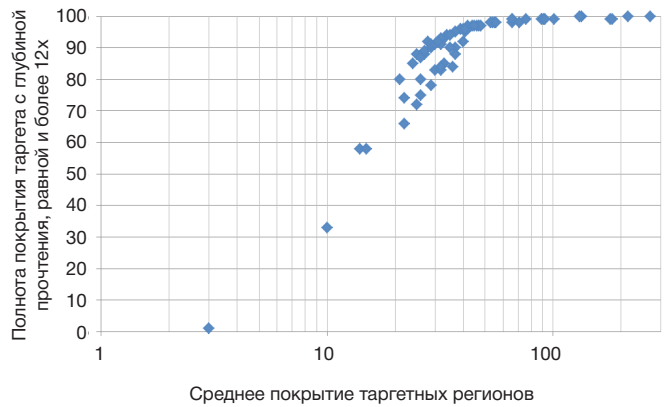


Рис. 3. Доля целевых регионов, покрытых 12x, в зависимости от среднего покрытия целевых регионов. Каждая точка соответствует одному образцу

Large table with multiple rows of numerical data, likely representing sequencing metrics or quality control results. It is divided into several distinct sections of data.

и новых реагентов для секвенирования. Более точные современные методы биоинформатики также позволяют увереннее фильтровать ошибки секвенирования без потери чувствительности.

ВЫВОДЫ

Нами было показано, что для достижения не менее чем 90 % покрытия целевых регионов на 12x или более, не-

обходимо получить количество данных, эквивалентное среднему покрытию таргета 40x после дедупликации. Данная величина может зависеть от используемого набора и протокола для обогащения, типа и длины ридов. К тому же в зависимости от протокола создания библиотек и получения исходного биоматериала обнаруживается разная степень дупликации при одинаковом объеме данных, что также должно быть учтено при расчете необходимого числа нуклеотидов на образец.

Литература

- Rabhani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet.* 2014; 59 (1): 5–15.
- de Bruin C, Dauber A. Insights from exome sequencing for endocrine disorders. *Nat Rev Endocrinol.* 2015; 11 (8): 455–64.
- Sims D, Sudbery I, Illott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet.* 2014; 15 (2): 121–32.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CJ et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature.* 2008; 56 (7218): 53–9.
- Ahn SM, Kim TH, Lee S, Kim D, Ghang H, Kim DS et al. The first Korean genome sequence and analysis: full genome sequencing for a socio-ethnic group. *Genome Res.* 2009; 19 (9): 1622–9.
- Wang J, Wang W, Li R, Li Y, Tian G, Goodman L et al. The diploid genome sequence of an Asian individual. *Nature.* 2008; 456 (7218): 60–5.
- Ajay SS, Parker SCJ, Abaan HO, Fuentes Fajardo KV, Margulies EH. Accurate and comprehensive sequencing of personal genomes. *Genome Res.* 2011; 21 (9): 1498–1505.
- Fang H, Wu Y, Narzisi G, O'Rawe JA, Barrón LT, Rosenbaum J et al. Reducing INDEL calling errors in whole genome and exome sequencing data. *Genome Med.* 2014; 6 (10): 89.
- Meynert AM, Bicknell LS, Hurler ME, Jackson AP, Taylor MS. Quantifying single nucleotide variant detection sensitivity in exome sequencing. *BMC Bioinformatics.* 2013; 14: 195.
- Meynert AM, Ansari M, Fitzpatrick DR, Taylor MS. Variant detection sensitivity and biases in whole genome and exome sequencing. *BMC Bioinformatics.* 2014; 19 (15): 247.
- Li Y, Sidore C, Kang HM, Boehnke M, Abecasis GR. Low-coverage sequencing: implications for design of complex trait association studies. *Genome Res.* 2011; 21 (6): 940–51.
- Illumina. Technical Note: Sequencing. Quality Scores for Next-Generation Sequencing [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf
- Clevenger J, Chavarro C, Pearl SA, Ozias-Akins P, Jackson SA. Single Nucleotide Polymorphism Identification in Polyploids: A Review, Example, and Recommendations. *Mol Plant.* 2015; 8 (6): 831–46.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010; 20 (9): 1297–303.
- Kim K, Seong MW, Chung WH, Park SS, Leem S, Park W et al. Effect of Next-Generation Exome Sequencing Depth for Discovery of Diagnostic Variants. *Genomics Inform.* 2015; 13 (2): 31–9.

References

- Rabhani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet.* 2014; 59 (1): 5–15.
- de Bruin C, Dauber A. Insights from exome sequencing for endocrine disorders. *Nat Rev Endocrinol.* 2015; 11 (8): 455–64.
- Sims D, Sudbery I, Illott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet.* 2014; 15 (2): 121–32.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CJ et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature.* 2008; 56 (7218): 53–9.
- Ahn SM, Kim TH, Lee S, Kim D, Ghang H, Kim DS et al. The first Korean genome sequence and analysis: full genome sequencing for a socio-ethnic group. *Genome Res.* 2009; 19 (9): 1622–9.
- Wang J, Wang W, Li R, Li Y, Tian G, Goodman L et al. The diploid genome sequence of an Asian individual. *Nature.* 2008; 456 (7218): 60–5.
- Ajay SS, Parker SCJ, Abaan HO, Fuentes Fajardo KV, Margulies EH. Accurate and comprehensive sequencing of personal genomes. *Genome Res.* 2011; 21 (9): 1498–1505.
- Fang H, Wu Y, Narzisi G, O'Rawe JA, Barrón LT, Rosenbaum J et al. Reducing INDEL calling errors in whole genome and exome sequencing data. *Genome Med.* 2014; 6 (10): 89.
- Meynert AM, Bicknell LS, Hurler ME, Jackson AP, Taylor MS. Quantifying single nucleotide variant detection sensitivity in exome sequencing. *BMC Bioinformatics.* 2013; 14: 195.
- Meynert AM, Ansari M, Fitzpatrick DR, Taylor MS. Variant detection sensitivity and biases in whole genome and exome sequencing. *BMC Bioinformatics.* 2014; 19 (15): 247.
- Li Y, Sidore C, Kang HM, Boehnke M, Abecasis GR. Low-coverage sequencing: implications for design of complex trait association studies. *Genome Res.* 2011; 21 (6): 940–51.
- Illumina. Technical Note: Sequencing. Quality Scores for Next-Generation Sequencing [Internet]. [cited 2017 Jun] Available from: https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf
- Clevenger J, Chavarro C, Pearl SA, Ozias-Akins P, Jackson SA. Single Nucleotide Polymorphism Identification in Polyploids: A Review, Example, and Recommendations. *Mol Plant.* 2015; 8 (6): 831–46.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010; 20 (9): 1297–303.
- Kim K, Seong MW, Chung WH, Park SS, Leem S, Park W et al. Effect of Next-Generation Exome Sequencing Depth for Discovery of Diagnostic Variants. *Genomics Inform.* 2015; 13 (2): 31–9.

СОСТОЯНИЕ ЛОКАЛЬНОГО ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДОВ

Н. Ю. Каткова¹✉, О. И. Бодрикова¹, А. В. Сергеева², И. М. Безрукова¹, К. Б. Покусаева¹

¹Кафедра акушерства и гинекологии, факультет повышения квалификации врачей, Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

²Кафедра эпидемиологии, медико-профилактический факультет, Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

Преждевременные роды (ПР) — одна из наиболее актуальных проблем современного акушерства. Появляется все больше данных о роли элементов врожденного иммунитета в развитии преждевременных родов инфекционного генеза. Целью нашего исследования являлось изучение особенностей состояния локального иммунного статуса при различных вариантах ПР. В исследовании приняли участие 77 беременных женщин, из которых 25 составили контрольную группу (своевременные роды). Основная группа была разделена на две подгруппы по типу ПР: 28 рожениц с преждевременным излитием вод при отсутствии регулярной родовой деятельности (подгруппа 1А) и 24 роженицы с истинными преждевременными родами (подгруппа 1Б). У всех пациенток определяли уровень экспрессии генов врожденного иммунитета: *IL1B*, *IL10*, *IL18*, *TNFA*, *TLR4*, *GATA3*, *CD68*, *B2M*. Биоматериал — соскоб из цервикального канала — анализировали с помощью тест-системы «ИмуноКвантэкс» («НПО ДНК-Технология», Россия). Выявили достоверное снижение экспрессии генов *TLR4* и *GATA3*, а также более высокий индекс воспаления ($Me = 99,5\%$, $p < 0,01$) у женщин с преждевременным разрывом плодных оболочек при недоношенной беременности в сравнении с женщинами из подгруппы 1Б с истинными ПР и контрольной группы. Достоверных различий по этим показателям между подгруппой 1Б и контрольной группой не обнаружили. Выявленные нами различия в состоянии локального иммунного статуса при двух вариантах ПР свидетельствуют о разных механизмах их развития.

Ключевые слова: преждевременные роды, локальный иммунный статус, врожденный иммунитет, синдром системного воспалительного ответа, цитокины

✉ Для корреспонденции: Каткова Надежда Юрьевна
ул. Н. Сусловой, д. 12, корп. 2, кв. 108, г. Нижний Новгород, 603106; katkova_nu@inbox.ru

Статья получена: 10.04.2017 Статья принята к печати: 24.04.2017

THE LOCAL IMMUNE PROFILE OF THE WOMAN AND DIFFERENT SCENARIOS OF PRETERM DELIVERY

Katkova NYu¹✉, Bodrikova OI¹, Sergeeva AV², Bezrukova IM¹, Pokusaeva KB¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Advanced Vocational Training, Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russia

²Department of Epidemiology, Faculty of Preventive Medicine, Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russia

Preterm delivery (PD) is one of the central challenges faced by contemporary obstetrics. There has been growing evidence of the role of the innate immune response in triggering infection-associated preterm labor. Our study aimed to investigate the local immune status of women in different PD scenarios. The study enrolled 77 pregnant women; 25 of them constituted the control group (delivery at term). The experimental group was divided into two subgroups based on the PD type: Subgroup 1A included 28 women with spontaneous premature rupture of membranes in the absence of active labor, and Subgroup 1B included 24 women who went into genuine preterm labor. Cervical scrape specimens were collected from all patients to determine the level of expression of the following innate immunity genes: *IL1B*, *IL10*, *IL18*, *TNFA*, *TLR4*, *GATA3*, *CD68*, and *B2M*. The tests were performed using the ImmunoQuantex assay by DNA-Technology, Russia. Compared to the genuinely preterm women from Subgroup 1B and the controls, the women with premature rupture of membranes demonstrated statistically significant reduction in the expression of *TLR4* and *GATA3* and a higher inflammatory index ($Me = 99.5\%$, $p < 0.01$). No significant differences in these parameters were observed between Subgroup 1B and the controls. The revealed differences in the local immunity profiles of women indicate that pathways leading to the scenarios of premature labor studied in this work are not the same.

Keywords: preterm delivery, local immune status, innate immunity, systemic inflammatory response syndrome, cytokines

✉ Correspondence should be addressed: Nadezhda Katkova
ul. N. Suslovoy, d. 12, korp. 2, kv. 108, Nizhny Novgorod, Russia, 603106; katkova_nu@inbox.ru

Received: 10.04.2017 Accepted: 24.04.2017

Преждевременные роды (ПР) остаются одним из наиболее актуальных исследовательских направлений в современном акушерстве [1]. Это связано не только с медицинской, но и с социальной значимостью проблемы: ПР обуславливают значительную неонатальную заболеваемость и смертность новорожденных. На долю недоношенных детей приходится 60–70 % случаев ранней неонатальной смертности, до 50 % неврологических заболеваний; мертворождение среди недоношенных детей встречается в 8–13 раз чаще, чем среди доношенных [2, 3].

Несмотря на повышение качества медицинской помощи, частота преждевременных родов не снижается, а в некоторых странах — растет. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно 15 миллионов детей рождаются преждевременно, т. е. на сроке до 37 недель беременности [4]. Частота ПР в разных странах составляет 5–18 %, в России — 6–15 % в зависимости от региона [5].

Преждевременные роды подразделяются на спонтанные (70–80 % всех случаев ПР) и индуцированные, которые связаны с состоянием здоровья беременной и/или плода [6, 7]. Самопроизвольные роды могут начинаться как с развития регулярной родовой деятельности при целом плодном пузыре (истинные преждевременные роды; на их долю приходится около 40–50 % случаев спонтанных ПР), так и с преждевременного разрыва плодных оболочек при отсутствии регулярной родовой деятельности [8, 9].

По данным литературы, около 40 % случаев ПР обусловлены инфекционными факторами [7, 8, 10]. К ведущему патогенетическому механизму в таких случаях относят развитие неспецифического системного воспалительного ответа (СВО) организма на инфекционные агенты. При синдроме СВО локальное повреждение тканей в зоне инокуляции патогенов вызывает совокупность системных реакций. Этот процесс ассоциирован с дисфункцией врожденного и приобретенного иммунитета и проявляется нарушением соотношения про- и противовоспалительных цитокинов. В настоящее время очень активно изучается роль цитокинов в развитии преждевременных родов [11]. Так, имеются сведения о том, что повышение уровня провоспалительных цитокинов в содержимом цервикального канала свидетельствует о возможном риске ПР [12]. Данные о состоянии локального иммунного статуса позволяют уточнять молекулярно-биологические аспекты развития различных вариантов ПР.

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей локального иммунного статуса при различных вариантах преждевременных родов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Нами на базе Дзержинского перинатального центра (Нижегородская область) в 2016–2017 гг. были обследованы 77 рожениц, которых разделили на две группы. Первую (основную) группу составили 52 женщины с диагнозом «спонтанные преждевременные роды» на сроке 22–36 недель беременности, вторую (контрольную) — 25 женщин со своевременными родами. Основная группа была разделена на 2 подгруппы — по вариантам развития ПР. В первую подгруппу (1А) включили 28 беременных с преждевременным разрывом плодных оболочек (ПРПО) при отсутствии регулярной родовой деятельности, во вторую (1Б) — 24 роженицы с развитием регулярной родовой деятельности при целом плодном пузыре. Возраст участ-

ниц исследования варьировал от 19 до 41 года и составил в среднем $29,8 \pm 5,0$ лет. Достоверных различий в группах по этому показателю выявлено не было ($p > 0,05$).

Общим критерием включения во все группы была одноплодная беременность. Критерии исключения из исследования являлись многоплодная беременность и тяжелые врожденные пороки развития плода.

Анализировали социально-экономическое положение женщин, акушерско-гинекологический и экстрагенитальный анамнез, заболеваемость острыми инфекциями во время беременности, измеряли массу и рост женщин и рассчитывали индекс массы тела.

Для оценки локального иммунного статуса рожениц с началом родов забирали соскоб из цервикального канала стерильным одноразовым зондом. Биоматериал помещали в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл, которые содержали 500 мкл среды для стабилизации ДНК. Для выделения нуклеиновых кислот из материала использовали наборы «Проба НК» («НПО ДНК-Технология», Россия). Далее осуществляли постановку теста «ИммуноКвантэкс» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). В данной тест-системе после выделения суммарного пула ДНК и РНК проводится реакция обратной транскрипции для получения матрицы м-РНК, комплементарной ДНК, которая в дальнейшем амплифицируется методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). После этапа амплификации по показателю индикаторного цикла программно рассчитывали уровень экспрессии мРНК генов врожденного иммунитета: *IL1B*, *IL10*, *IL18*, *TNFA*, *TLR4*, *GATA3*, *CD68*, *B2M*. На основе интегральной оценки полученных уровней экспрессии генов делали заключение о наличии или отсутствии локальной воспалительной реакции по величине индекса воспаления (ИВ). Значение ИВ более 60 % оценивали как воспаление, менее 50 % — как отсутствие воспалительной реакции, диапазон значения 50–60 % — как «нельзя исключить» (серая зона).

Анализ полученных данных проводили при помощи программ Microsoft Excel 2010 (надстройка AtteStat) и Statistica v10 (StatSoft, США). Количественные данные (уровни экспрессии генов) представляли в виде медианы (Me) и межквартильного интервала (нижний (0,25) и верхний (0,75) квартили). Для определения достоверности различий между исследуемыми группами рассчитывали критерий Манна-Уитни. Для оценки качественных признаков применяли хи-квадрат Пирсона с поправкой Йейтса, при частотах меньше 5 — двусторонний точный критерий Фишера (p). Для оценки связи изучаемых факторов с развитием преждевременных родов рассчитывали величину отношения шансов (ОШ) с доверительным интервалом 95 %. Для всех видов анализа статистически достоверными считались значения $p < 0,05$.

Проведение исследования было одобрено этическим комитетом Нижегородской государственной медицинской академии (протокол № 12 от 05.10.2015). Все участницы дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При анализе социально-экономического положения пациенток выяснили, что в основной группе (с ПР) достоверно больше пациенток со средним образованием — 65,4 % ($\chi^2 = 6,3$; $p = 0,012$) — и одиноких женщин — 17,3 % ($p = 0,02$).

При оценке массо-ростовых показателей обнаружили, что более высоким значением индекса массы тела (ИМТ) обладали пациентки основной группы, где среднее значение показателя составило $25,4 \pm 5,2$ кг/м², в то время как в контрольной группе — $22,5 \pm 2,3$ кг/м² ($p = 0,009$). Статистически значимых отличий по росту среди беременных разных групп не отметили ($p > 0,05$).

Изучение особенностей акушерско-гинекологического анамнеза показало, что только в основной группе встречались пациентки с ПР в анамнезе (15,4 %, $p = 0,048$; ОШ = 9,7 [0,5–175,9]). Также в данной группе достоверно чаще, чем в контрольной, присутствовали женщины с двумя и более лечебно-диагностическими выскабливаниями полости матки в анамнезе (34,6 %, $p = 0,013$; ОШ = 6,1 [1,3–28,8]).

Нами были выявлены отличительные особенности акушерско-гинекологического анамнеза среди беременных с различными вариантами преждевременных родов. Так, в подгруппе с истинными ПР (подгруппа 1Б) статистически чаще, чем в подгруппе 1А, встречались первобеременные женщины — 45,8 % ($p = 0,038$). Пациентки подгруппы 1Б также достоверно раньше начинали жить половой жизнью, при этом средний возраст начала половой жизни составил $15,6 \pm 1,3$ года ($p = 0,009$). Кроме того, в этой подгруппе 37,5 % женщин отмечали наличие воспалительных заболеваний органов малого таза до беременности. Это достоверно больше, чем в подгруппе 1А ($p = 0,045$).

Анализ экстрагенитальной патологии исследуемых пациенток показал, что в основной группе было больше беременных с хронической никотиновой зависимостью (34,6 %, $p = 0,013$; ОШ = 6,0 [1,29–28,8]) и хроническими специфическими инфекциями (хронический гепатит С, хронический гепатит В, ВИЧ-инфекция): 13,5 %, $p = 0,047$; ОШ = 8,4 [0,5–153,3].

Наиболее частым осложнением беременности в основной группе в нашем исследовании оказалась угроза прерывания беременности, которая отмечалась у 44,2 % пациенток. В то же время частота встречаемости этой патологии в контрольной группе составила 12 %, что достоверно меньше, чем в основной группе ($p = 0,017$; ОШ = 4,9 [1,3–18,7]). Формирование истмико-цервикальной недостаточности во втором триместре у пациенток с ПР было выявлено в 19,2 % случаев, в контрольной группе беременных с ИЦН отмечено не было ($p = 0,025$; ОШ = 12,6 [0,7–224,3]).

Пациентки основной группы достоверно чаще в сравнении с пациентками контрольной группы болели острыми инфекционными заболеваниями (ОРВИ, инфекция мочеполовых путей, обострение пиелонефрита) во время беременности: 36,5 %, $p = 0,032$; ОШ = 4,2 [1,1–16,0]. Обращает на себя внимание тот факт, что у беременных с ПРПО (подгруппа 1А) чаще диагностировалась острая инфекция по сравнению с женщинами с истинными преждевременными родами (подгруппа 1Б) (46,4 %, $p = 0,044$). Только в группе с преждевременными родами были зарегистрированы признаки хронической плацентарной недостаточности, включая синдром задержки роста плода: 13,5 % случаев, ОШ 8,4 [0,5–153,3]. При этом следует отметить, что достоверно чаще данное осложнение беременности встречалось в подгруппе 1Б (25 %, $p = 0,04$).

Наиболее интересные данные были получены нами при изучении профиля экспрессии генов *IL1B*, *IL10*, *IL18*, *TNFa*, *TLR4*, *GATA3*, *CD68* и *B2M* в клетках соскобов из цервикального канала. При использовании тест-системы «ИммюноКвантэкс» мы обнаружили, что определение отдельных

показателей локального иммунного ответа не имеет прогностической ценности в отношении преждевременных родов. Так, оказалось, что не было достоверных различий между уровнями экспрессии генов *IL1B*, *TNFa*, *CD68* и *B2M* ни по группам исследуемых, ни внутри основной группы, т. е. по подгруппам ($p > 0,05$). В то же время у пациенток с ПРПО без развития регулярной родовой деятельности (подгруппа 1А) значение экспрессии *TLR4* было достоверно ниже, чем у женщин с истинными преждевременными родами (подгруппа 1Б) ($p = 0,037$). В контрольной группе уровень экспрессии *TLR4* оказался самым высоким среди всех групп, а также статистически значимо отличался от значения показателя в подгруппе 1А ($p = 0,021$) и не отличался от значения показателя в подгруппе 1Б ($p = 0,408$).

Достоверное различие было выявлено нами по уровню экспрессии транскрипционного фактора *GATA3*. Его минимальное значение отмечалось в подгруппе 1А, а максимальное — в подгруппе 1Б ($p = 0,012$). При этом между значением показателя в подгруппе 1Б и контрольной значимого различия не было ($p > 0,05$).

Также были отмечены достоверные различия в уровнях экспрессии генов *IL10* и *IL18* между подгруппами: в подгруппе 1А значения данных показателей были достоверно ниже в сравнении с подгруппой 1Б ($p = 0,021$ и $p = 0,025$ соответственно).

Таким образом, увеличение или уменьшение экспрессии отдельных генов белков, обладающих про- и противовоспалительным действием, не дают полного представления об изменениях в состоянии мукозального иммунитета. В то же время интегральная оценка соотношений уровней экспрессии исследуемых генов и рассчитанный на ее основе индекс воспаления позволяет сделать заключение о наличии или отсутствии воспалительной реакции. Полученные нами значения ИВ (таблица) имели принципиальные различия как между основной и контрольной группами, так и внутри основной группы. Самым высоким ИВ обладали пациентки подгруппы 1А (с ПРПО) — 99,5 %, в то время как в подгруппе 1Б данный показатель составил 27,2 % ($p < 0,01$), а в группе контроля — 13,1 % ($p < 0,01$). Значения ИВ в подгруппе 1Б и группе контроля оказались сопоставимы ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время поиску причин преждевременных родов и определению возможности их прогнозирования посвящено много работ [1, 7, 11, 13]. Однако, несмотря на очевидный прогресс в исследованиях, многие вопросы остаются не до конца выясненными. К факторам риска развития ПР большинство исследователей относят: медицинские аборт в анамнезе, индуцированную беременность, поздние выкидыши, конизацию шейки матки, цервико-вагинальную инфекцию, инфекцию мочевыделительной системы, тяжелую экстрагенитальную патологию, никотиновую зависимость, низкий уровень жизни, стрессы [14]. Наше исследование подтвердило данные мировой литературы. Мы наблюдали высокий индекс массы тела у значительного числа женщин с ПР в сравнении с контрольной группой ($p = 0,009$). Факторами риска ПР в нашем исследовании явились: указания на преждевременные роды в анамнезе, два и более внутриматочных вмешательства, курение, нарушение жирового обмена, инфекции острые и хронические.

Уровни экспрессии исследованных генов в подгруппах с преждевременными родами и группой контроля (медиана и межквартильный интервал)

Ген	Основная группа (ПР, n = 52)		p ¹	Контрольная группа (n = 25)	p ²	p ³
	Подгруппа 1А, n = 28	Подгруппа 1Б, n = 24				
<i>IL1b</i>	5,55 (5,05–6,1)	5,75 (5,35–6,2)	0,435	5,9 (5,5–6,3)	0,148	0,406
<i>IL10</i>	2,55 (2,1–3,05)	3,1 (2,85–3,4)	0,021	2,9 (2,25–3,3)	0,205	0,477
<i>IL18</i>	4,6 (3,7–4,9)	5,1 (4,65–5,55)	0,025	4,9 (4,1–5,35)	0,088	0,464
<i>TNFa</i>	3,85 (3,4–4,25)	4,1 (3,7–4,5)	0,061	4,0 (3,5–4,3)	0,570	0,714
<i>TLR4</i>	3,5 (3,2–3,7)	3,9 (3,4–4,25)	0,037	4,1 (3,5–4,3)	0,021	0,408
<i>GATA3</i>	3,6 (2,95–3,9)	4,2 (3,6–4,45)	0,012	4,05 (3,45–4,5)	0,038	0,618
<i>CD68</i>	4,5 (4,15–4,7)	4,85 (4,4–5,15)	0,057	4,7 (4,45–4,95)	0,169	0,589
<i>B2M</i>	5,6 (5,25–5,85)	5,7 (5,3–6,1)	0,904	5,9 (5,4–6,16)	0,117	0,668
ИВ (%)	99,5 (95,3–99,9)	27,2 (12,8–58,9)	< 0,01	13,1 (10,5–17,7)	< 0,01	> 0,05

Примечание. p¹ — p-значение при сравнении показателей между подгруппой 1А и подгруппой 1Б; p² — p-значение при сравнении показателей между подгруппой 1А и контрольной группой; p³ — p-значение при сравнении показателей между подгруппой 1Б и контрольной группой.

В последние годы развитие ПР связывают с нарушением баланса про- и противовоспалительных молекул в организме женщины. При ПР с преждевременным разрывом плодных оболочек индекс воспаления с большей вероятностью ($p < 0,01$) будет высоким. По данным отечественных и зарубежных авторов, наиболее распространенным патогенетическим механизмом развития ПРПО является инфицирование нижнего полюса плодного пузыря [9, 15]. При попадании патогенов в организм срабатывает первая линия иммунологической защиты, представленная элементами врожденного иммунитета. Первичный воспалительный ответ на патогены опосредован специфическими Toll-подобными рецепторами (TLRs), активация которых происходит при взаимодействии с клеточной стенкой микроорганизмов. Результатом этого взаимодействия является увеличение синтеза провоспалительных цитокинов, хемокинов и простагландинов. Известно, что увеличение синтеза цитокинов в шейке матки является причиной лейкоцитарной инфильтрации и открытия шейки матки. Увеличивающаяся при этом активность протеаз может приводить к дестабилизации плодных оболочек и их преждевременному разрыву [16]. Участие TLRs в развитии преждевременных родов подтверждено многими исследованиями [17]. Так, Тютюнник и соавт. [13] показали достоверное снижение экспрессии гена *TLR4* в группе женщин с преждевременными родами, однако эта закономерность выявлена при наличии дисбиотических нарушений микрофлоры влагалища у данных пациенток.

По данным других авторов [18, 19], при преждевременных родах наблюдается увеличение экспрессии гена *TLR4* и *TLR2* непосредственно перед родами как в слизистой оболочке цервикального канала, так и в плацентарной ткани. Повышенная экспрессия генов TLRs приводит к выбросу провоспалительных цитокинов, которые попадают в кровоток, в том числе и кровоток плода, и способствуют преждевременной активации кортикотропин-рилизинг гормона и плацентарно-надпочечниковой эндокринной системы. Результат — повышение тонуса матки и возможность развития ПР.

В нашем исследовании мы не обнаружили достоверных различий между основной и контрольной группами по уровням экспрессии большинства генов врожденного иммунитета ($p > 0,05$). Как известно, в норме при развитии физиологической беременности цитокины регулируют наступление родовой деятельности. Началу родов предшествует инфильтрация плаценты и окружающих материнских тканей различными цитокинами даже при от-

сутствии инфекции. Результатом этой активации является синтез провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, IL-8, TNF и простагландинов, стимулирующих сокращение матки [20].

В нашей работе было установлено, что достоверной разницы между основной и контрольной группами по уровню экспрессии гена *TLR4* нет ($p > 0,05$), что связано, по-видимому, с большой разнородностью синдрома ПР. Однако изучение экспрессии генов *TLR4* и *GATA3* по подгруппам показало различия в их содержании при разных вариантах развития ПР. Так, у пациенток подгруппы 1А экспрессия *TLR4* была достоверно снижена ($p = 0,037$) в сравнении с пациентками подгруппы 1Б (истинные ПР) и пациентками контрольной группы ($p = 0,021$). В то же время различия в уровне экспрессии *TLR4* между подгруппой 1Б и группой контроля были недостоверны ($p > 0,05$). Похожая тенденция наблюдалась в отношении экспрессии гена *GATA3*, где минимальные значения показателя были отмечены у женщин в подгруппе 1А ($p < 0,05$ при сравнении с результатами в подгруппе 1Б). Различия в сравнении с контролем были недостоверными ($p > 0,05$).

В доступной нам литературе нет упоминаний о значимости индекса воспаления в развитии ПР. В нашем исследовании ИВ составил 99,5 % у женщин с ПРПО (подгруппа 1А), что достоверно выше ($p < 0,01$) значения показателя в подгруппе 1Б — 27,2 %.

По всей видимости, соотношение уровней экспрессии генов *TLR4/GATA3* и индекс воспаления могут быть своеобразными маркерами начала преждевременных родов. Если провоспалительные молекулы численно преобладают над противовоспалительными, запускается каскад реакций, приводящий к развитию синдрома системного воспалительного ответа и, как следствие, к преждевременному разрыву плодных оболочек. В случае истинных преждевременных родов, по-видимому, задействуются другие механизмы активации системы «мать-плацента-плод», и их изучение продолжается.

Выводы

Исследование с тестом «ИммуноКвантэкс» у пациенток со спонтанными преждевременными родами позволяет определить состояние локального иммунного статуса и вариант развития ПР. При этом имеет значение определение не отдельных факторов мукозального иммунитета, обладающих про- и противовоспалительными свойствами, а именно их соотношения и расчет индекса воспаления.

Нами были выявлены особенности в состоянии локального иммунного статуса для различных вариантов преждевременных родов. Так, у рожениц с ПР и преждевременным разрывом плодных оболочек в иммунном ответе преобладает реакция воспаления со снижением уровня экспрессии генов *TLR4* и *GATA3*. У этих пациенток индекс воспаления выше, чем у женщин с истинными ПР и своевременными родами. Таким образом, местная воспалительная реакция является причиной преждевременных родов по типу ПРПО, причем в этом случае снижается значение противовоспалительных факторов, а не растет значение провоспалительных факторов. Что касается варианта истинных преждевременных родов, то нами не были об-

наружены достоверные отличия в состоянии локального иммунного статуса у таких пациенток и своевременно родивших женщин, что указывает на единый патогенетический механизм реализации родового акта.

Дальнейшего изучения требует возможность использования тест-системы «ИммуноКвантэкс» в качестве прогностического инструмента для оценки вероятности реализации спонтанных ПР у беременных с угрожающими ПР. Данные о наличии местной воспалительной реакции у пациенток из групп высокого риска по развитию ПР могут позволить своевременно провести комплекс профилактических мероприятий, направленных на пролонгирование беременности.

Литература

1. Савельева Г. М., Шалина Р. И., Курцер М. А., Клименко П. А., Сичинава Л. Г., Панина О. Б. и др. Преждевременные роды как важнейшая проблема современного акушерства. Акушерство и гинекология. 2012; 8 (2): 4–10.
2. Серов В. Н., Сухорукова О. И. Профилактика преждевременных родов. Русский медицинский журнал. 2014; (1): 3–10.
3. Mattison D, Damus K, Fiore E, Petrini J, Alter C. Preterm delivery: a public health perspective. Paediatr Perinatal Epidemiol. 2001; 15 (2): 7–16.
4. World Health Organization [Интернет]. Media Centre. Preterm Birth. Factsheet [обновлено: ноябрь 2016 г.; процитировано: апрель 2017 г.] Доступно по ссылке: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/>
5. Сухих Г. Т., редактор. Кокрановское руководство: Беременность и роды. М.: Логосфера; 2010. 440 с.
6. Радзинский В. Е. Акушерская агрессия. М.: Изд-во журнала StatusPraesens; 2012. 672 с.
7. Romero R, Goncalves LF, Chaiworapongsa T. Mechanisms of Preterm Labor and Preterm Premature Rupture of the Membranes. В книге: Kurjak A, Chervenak F, editors. Textbook of Perinatal Medicine. 2nd ed. Jaypee Brothers Medical Publishers; 2015. 1173–86.
8. Кан Н. Е., Санникова М. В., Амирасланов Э. Ю., Тютюнник В. Л. Клинические предикторы прогнозирования преждевременного разрыва плодных оболочек. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2013; 12 (3): 12–8.
9. ACOG Practice Bulletin No. 160: premature rupture of membranes. Obstet Gynecol. 2016 Jan; 127 (1): e39–51.
10. Власова Т. А., Вальдман С. Ф., Иванова Н. В. и др. Факторы риска и особенности ведения преждевременных родов. Репродуктивное здоровье женщины. 2000; 2: 153–60.
11. Меджидова М. К., Тютюнников В. Л., Кан Н. Е., Курчакова Т. А., Кокоева Д. Н. Роль синдрома системного воспалительного ответа в развитии преждевременных родов. Проблемы репродукции. 2016; (2): 116–20.
12. Сидельникова В. М., Сухих Г. Т. Невынашивание беременности. М.: МИА; 2010. 536 с.
13. Тютюнник В. Л., Курчакова Т. А., Кан Н. Е., Непша О. С., Донников А. Е., Меджидова М. К. и др. Локальные факторы врожденного иммунитета в прогнозировании преждевременных родов. Акушерство и гинекология. 2016; (10): 59–63.
14. Saito S. Cytokine network at the fetomaternal interface. J Reprod Immunol. 2000 Jul; 47 (2): 87–103.
15. Петров С. Н. Проблема преждевременного разрыва плодных оболочек и тактика ведения преждевременных родов. Акушерство, гинекология и репродукция. 2012; 6 (1): 50–2.
16. Макаров О. В., Романовская В. В., Кузнецов П. А., Магомедова А. М. Иммунологические аспекты преждевременных родов инфекционного генеза. Вестник РУДН, сер. Медицина. Акушерство и гинекология. 2011; (6): 373–9.
17. Jones NM, Holzman C, Friderici KH, Jernigan K, Chung H, Wirth J et al. Interplay of cytokine polymorphisms and bacterial vaginosis in the etiology of preterm delivery. J Reprod Immunol. 2010 Dec; 87 (1–2): 82–9.
18. Adams Waldorf KM, Persing D, Novy MJ, Sadowsky DW, Gravett MG. Pretreatment with toll-like receptor 4 antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced preterm uterine contractility, cytokines, and prostaglandins in rhesus monkeys. Reprod Sci. 2008 Feb; 15 (2): 121–7.
19. Макаров О. В., Бахарева И. А., Ганковская Л. В., Романовская В. В. Молекулярные механизмы инфекционного невынашивания беременности. Российский медицинский журнал. 2009; (2): 24–8.
20. Osman I, Young A, Ledingham MA, Thomson AJ, Jordan F, Greer IA et al. Leukocyte density and proinflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. Mol Hum Reprod. 2003 Jan; 9 (1): 41–5.

References

1. Savelyeva GM, Shalina RI, Kurtser MA, Klimenko PA, Sichinava LG, Panina OB et al. [Preterm birth as the most important problem of modern obstetrics]. Obstetrics and Gynecology. 2012; 8 (2): 4–10. Russian.
2. Serov VN, Sukhorukova OI. Profilaktika prezhdevremennykh rodov. Russkiy meditsinskiy zhurnal. 2014; (1): 3–10. Russian.
3. Mattison D, Damus K, Fiore E, Petrini J, Alter C. Preterm delivery: a public health perspective. Paediatr Perinatal Epidemiol. 2001; 15 (2): 7–16.
4. World Health Organization [Internet]. Media Centre. Preterm Birth. Factsheet [updated 2016 Nov; cited 2017 Apr] Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/>
5. Sukhikh GT, editor. Kokranovskoe rukovodstvo: Beremennost' i rody. Moscow: Logosfera; 2010. 440 p. Russian.
6. Radzinskiy VE. Akusherskaya agressiya. Moscow: Izdatel'stvo zhurnala StatusPraesens; 2012. 672 p. Russian.
7. Romero R, Goncalves LF, Chaiworapongsa T. Mechanisms of Preterm Labor and Preterm Premature Rupture of the Membranes. In: Kurjak A, Chervenak F, editors. Textbook of Perinatal Medicine. 2nd ed. Jaypee Brothers Medical Publishers; 2015. 1173–86.
8. Kan NE, Sannikova MV, Amiraslanov EYu, Tyutyunnik VL. Klinicheskie prediktory prognozirovaniya prezhdevremennogo razryva plodnykh obolochek. Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii. 2013; 12 (3): 12–8. Russian.
9. ACOG Practice Bulletin No. 160: premature rupture of membranes. Obstet Gynecol. 2016 Jan; 127 (1): e39–51.

10. Vlasova TA, Valdman SF, Ivanova NV et al. Faktory riska i osobennosti vedeniya prezhdvremennykh rodov. *Reproduktivnoe zdorov'e zhenshchiny*. 2000; 2: 153–60. Russian.
11. Medzhidova MK, Tyutyunnikov VL, Kan NE, Kurchakova TA, Kokoeva DN. [The role of systemic inflammatory response syndrome in preterm labour development]. *Problemy reproduksii*. 2016; (2): 116–20. Russian.
12. Sidelnikova VM, Sukhikh GT. *Nevynashivanie beremennosti*. Moscow: MIA; 2010. 536 p. Russian
13. Tyutyunnik VL, Kurchakova TA, Kan NE, Nepsha OS, Donnikov AE, Medzhidova MK et al. [Local factors of innate immunity in the prediction of preterm birth]. *Obstetrics and Gynecology*. 2016; (10): 59–63. Russian.
14. Saito S. Cytokine network at the feto–maternal interface. *J Reprod Immunol*. 2000 Jul; 47 (2): 87–103.
15. Petrov SN. Problema prezhdvremennogo razryva plodnyh obolochek i taktika vede-niya prezhdvremennykh rodov. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduksiya*. 2012; 6 (1): 50–2. Russian.
16. Makarov OV, Romanovskaja VV, Kuznetsov PA, Magomedova AM. [Immunological aspects of premature births infectious genesis]. *Vestnik RUDN, series Meditsina. Akusherstvo i ginekologiya*. 2011; (6): 373–9. Russian.
17. Jones NM, Holzman C, Friderici KH, Jernigan K, Chung H, Wirth J et al. Interplay of cytokine polymorphisms and bacterial vaginosis in the etiology of preterm delivery. *J Reprod Immunol*. 2010 Dec; 87 (1–2): 82–9.
18. Adams Waldorf KM, Persing D, Novy MJ, Sadowsky DW, Gravett MG. Pretreatment with toll-like receptor 4 antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced preterm uterine contractility, cytokines, and prostaglandins in rhesus monkeys. *Reprod Sci*. 2008 Feb; 15 (2): 121–7.
19. Makarov OV, Bakhareva IA, Gankovskaya LV, Romanovskaya VV. Molekulyarnye mekhanizmy infektsionnogo nevnashivaniya beremennosti. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; (2): 24–8. Russian.
20. Osman I, Young A, Ledingham MA, Thomson AJ, Jordan F, Greer IA et al. Leukocyte density and proinflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod*. 2003 Jan; 9 (1): 41–5.

ПРИМЕНЕНИЕ РЕАБИЛИТАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ BALANCE TUTOR ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФУНКЦИИ РАВНОВЕСИЯ И ХОДЬБЫ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ОСТРОГО НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Е. Ю. Сергеевко¹, С. А. Воловец², Л. Ю. Даринская² ✉, И. В. Житарева³, А. И. Журавлева⁴, А. В. Буторина⁵, Ю. А. Яшина², О. В. Волкова²

¹ Кафедра реабилитологии и физиотерапии, факультет дополнительного профессионального образования, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Научно-практический центр медико-социальной реабилитации инвалидов имени Л. И. Швецовой, Москва

³ Кафедра медицинской кибернетики и информатики, медико-биологический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

⁴ Кафедра физической терапии, спортивной медицины и медицинской реабилитации, терапевтический факультет, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва

⁵ Кафедра реабилитации, спортивной медицины и физической культуры, педиатрический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Современное оборудование позволяет проводить координаторные тренировки в статическом и динамическом режиме с целью профилактики падения в статике и при ходьбе. Целью исследования стало обоснование применения системы для восстановления статического и динамического равновесия BalanceTutor у пациентов с последствиями острого нарушения мозгового кровообращения. Обследованы 72 пациента с нарушением постурального баланса в позднем восстановительном периоде. В основной группе отмечено статистически значимое уменьшение площади статокинезиограммы и скорости перемещения центра давления как в положении «глаза открыты» ($p = 0,0476$ и $p = 0,0176$ соответственно), так и в положении «глаза закрыты» ($p = 0,0072$ и $p = 0,0037$ соответственно). К окончанию курса реабилитации в основной группе зафиксировано достоверное увеличение амплитуды кривой максимального мышечного напряжения на стороне двигательных нарушений в *m. peroneus longus* ($p = 0,0117$), что было сопоставимо с увеличением мышечной силы в нижних конечностях пораженной стороны согласно 6-балльной шкале оценки мышечной силы (по L. McPeak; M. Вейсс). Отмечено улучшение показателей походки ($p = 0,0513$) и устойчивости ($p = 0,0274$) по шкале Тинетти. Применение системы BalanceTutor в комплексной реабилитации пациентов с последствиями острого нарушения мозгового кровообращения является эффективным и целесообразным.

Ключевые слова: острое нарушение мозгового кровообращения, постуральный баланс, система для восстановления статического и динамического равновесия

✉ Для корреспонденции: Даринская Любовь Юрьевна
ул. Лодочная, д. 15, корп. 2, г. Москва, 125362; bespoyasnaya85@mail.ru

Статья получена: 22.06.2017 Статья принята к печати: 26.06.2017

THE USE OF THE BALANCE TUTOR REHABILITATION TREADMILL FOR BALANCE AND GAIT RECOVERY IN POSTSTROKE PATIENTS

Sergeenko EYu¹, Volovets SA², Darinskaya LYu² ✉, Zhitareva IV³, Zhuravleva AI⁴, Butorina AV⁵, Yashinina YuA², Volkova OV²

¹ Department of Rehabilitation Sciences and Physical Therapy, Faculty of Continuing Professional Education Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Shvetsova Research and Care Center for Medical and Social Rehabilitation of the Disabled, Moscow, Russia

³ Department of Medical Cybernetics and Informatics, Biomedical Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Department of Physical Therapy, Sports Medicine and Medical Rehabilitation, Russian Academy of Continuing Medical Education of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

⁵ Department of Rehabilitation, Sports Medicine and Physical Education, Faculty of Pediatrics, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

State-of-the-art rehabilitation equipment offers a wide range of static and dynamic exercise programs for fall prevention by improving balance control during standing or walking. Our study aimed to provide a rationale for the use of the BalanceTutor rehabilitation treadmill to improve static and dynamic balance in patients who had suffered an acute cerebrovascular accident. The study included 72 patients with postural balance impairments in their late recovery period. In the experimental group, center of pressure (COP) sway area and COP velocity decreased significantly, measured with patients' eyes opened ($p = 0.0476$ and $p = 0.0176$, respectively) and closed ($p = 0.0072$ and $p = 0.0037$, respectively). At the end of the rehabilitation program, we observed a statistically significant increase in the electromyographic signal amplitude on the stroke-affected side of the body in *m. peroneus longus* ($p = 0.0117$), consistent with the regained muscle strength in the lower extremities of the affected body side measured by McPeak and Veys 6-point scales. Tinetti gait and balance scores also improved ($p = 0.0513$ and $p = 0.0274$, respectively). Thus, the use of the BalanceTutor treadmill in the rehabilitation of poststroke patients proves to be effective and reasonable.

Keywords: acute cerebrovascular accident, postural balance, equipment for improving static and dynamic balance

✉ Correspondence should be addressed: Lubov Darinskaya
ul. Lodochnaya, d. 15, korp. 2, Moscow, Russia, 125362; bespoyasnaya85@mail.ru

Received: 22.06.2017 Accepted: 26.06.2017

Среди последствий острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), приводящих к инвалидности, наиболее часто встречаются нарушения двигательных и координаторных функций — 81,2 % общего числа пациентов. Одной из основных задач медико-социальной реабилитации больных после инсульта является восстановление статолокомоторных функций, совершенствование которых и определяет социальную независимость и трудоспособность пациента [1–3]. На протяжении ряда лет для восстановления статического равновесия у пациентов после ОНМК применяли координаторные занятия с использованием стабилметрической платформы и виртуальной реальности [4–6].

В мировой реабилитационной практике предложены методики тренировки постурального баланса, направленные на активацию реактивных постуральных синергий, предотвращающих падение человека, за счет возвращения центра тяжести в пределы площади опоры посредством шага в сторону падения. Реализация таких координаторных тренировок осуществляется путем спонтанных дестабилизирующих воздействий на пациента в ходьбе по беговой дорожке со смещением вперед–назад либо в положении стоя на платформе с отклонениями в различные стороны [7–13].

Внедрение современного оборудования в реабилитационную практику позволяет проводить координаторные тренировки в статическом и динамическом режимах с одновременной коррекцией двигательного стереотипа, инициируя неожиданное постуральное возмущение за счет дестабилизирующего воздействия в определенную фазу шага [14]. Перспективным направлением в плане тренировки постурального баланса, коррекции двигательного стереотипа и профилактики падений у пациентов после ОНМК является применение системы для восстановления статического и динамического равновесия BalanceTutor (MediTouch, Израиль) (рис. 1).

Целью исследования было обоснование применения системы для восстановления статического и динамического равновесия BalanceTutor у пациентов с последствиями ОНМК.



Рис. 1. Система BalanceTutor

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проходило в НПЦ МСР имени Л. И. Швецовой с марта по июнь 2017 г. В него вошли пациенты с синдромом центрального гемипареза (гемипарезы легкой и умеренной степени выраженности) после ОНМК (длительностью заболевания не более 1 года) в бассейне средней мозговой артерии, имеющие нарушение постурального баланса.

Критериями исключения из исследования были:

- вес пациента более 135 кг;
- контрактуры суставов нижних конечностей;
- состояние после эндопротезирования крупных суставов;
- неконсолидированные переломы позвоночника и конечностей, нестабильный остеосинтез;
- открытые повреждения кожи в области нижних конечностей и туловища;
- заболевания дыхательной и сердечно-сосудистой систем в стадии декомпенсации;
- тяжелые сосудистые заболевания нижних конечностей (тромбофлебит, флеботромбоз);
- выраженный остеопороз;
- терминальная стадия хронической почечной, печеночной недостаточности;
- тяжелые когнитивные нарушения, неконтактное или агрессивное поведение, психоорганический синдром;
- необходимость соблюдения постельного режима.

В исследовании приняли участие 72 пациента с нарушением постурального баланса после ОНМК в бассейне средней мозговой артерии в позднем восстановительном периоде. Методом рандомизации пациенты были распределены на две сопоставимые группы. В основную группу вошли 37 пациентов, средний возраст — $58 \pm 5,3$ года; в группу сравнения — 35 человек, средний возраст — $56 \pm 4,8$ года. В основной группе 30 (81,1 %) пациентов перенесли ишемический инсульт, 7 (18,9 %) — геморрагический; в группе сравнения 27 (77,1 %) — ишемический, 8 (22,9%) — геморрагический. Состав пациентов по половому признаку: в основной группе 20 (54,1 %) мужчин и 17 (45,9 %) женщин; в группе сравнения — 18 (51,4 %) мужчин и 17 (48,6 %) женщин. Длительность заболевания в основной группе составила $6,8 \pm 0,4$ мес., в группе сравнения — $6,4 \pm 0,2$ мес.

В ходе исследования для оценки эффективности предлагаемой методики применяли: электронейромиографическое (ЭНМГ) исследование (комплекс электронейромиографический компьютеризированный четырехканальный «Нейромиограф-01-МБН» с прилагаемым компьютерным программным обеспечением; Научно-медицинская фирма МБН, Россия); компьютерная стабилметрия (КС) (специализированный комплекс «МБН Стабило» с прилагаемым специально разработанным пакетом программного обеспечения «Стабилметрия»; Научно-медицинская фирма МБН, Россия), 6-балльная шкала оценки мышечной силы (по L. McPeak; M. Вейсс), шкала спастичности Ашфорта (по R. Bohannon, V. Smith; D. Wade), функциональная шкала Тинетти.

Реабилитационная программа у пациентов обеих групп была идентичной и включала симптоматическую медикаментозную терапию, физиотерапевтическое лечение (магнитотерапию, парафинотерапию, массаж пораженных конечностей и рефлексорных зон), лечебную физкультуру (координаторную лечебную гимнастику, циклическую механотерапию для верхних и нижних конечностей).

Дополнительно с пациентами основной группы проводили занятия с использованием системы BalanceTutor в течение 20 мин (18 процедур, 6 занятий в неделю).

Авторами данной статьи была разработана методика координаторных тренировок на системе для восстановления статического и динамического равновесия BalanceTutor [15]. Занятия проводили в динамическом режиме «триггерные занятия» в программе «компенсаторная реакция» с акцентом компенсаторного шага на пораженную конечность. С помощью датчиков с обратной связью осуществлялось распределение нагрузки на нижние конечности и контроль их положения в пространстве. Во время тренировки от пациента требовалось удерживать равновесие при ходьбе по беговой дорожке в прямом направлении (рис. 2, А, Б) и боковом — приставным шагом (рис. 2, В).

В процессе реабилитации осуществлялось постепенное увеличение рабочих параметров системы (амплитуды отклонения платформы, скорости движения беговой дорожки, времени тренировки) от первой процедуры к последней. На первом занятии время тренировки составляло 10 мин, из них пациент шел прямо 7 мин (рис. 2 А, Б), далее шел боком приставным шагом в сторону пораженной конечности 3 мин (рис. 2, В). Далее каждую 4-ю процедуру постепенно увеличивалась амплитуда дестабилизирующих воздействий. С 4-й процедуры боковые колебания увеличивались до 15 см в каждую сторону; отклонения вперед и назад — в пределах 10 см в каждую сторону; продолжительность занятия — 12 мин (8 мин прямо, 4 мин приставным шагом). С 8-й процедуры боковые колебания увеличивались до 18 см в каждую сторону; отклонения вперед и назад — в пределах 13 см в каждую сторону; продолжительность занятия — 15 мин (10 мин прямо, 5 мин приставным шагом). С 12-й процедуры боковые колебания увеличивались до 20–22 см в каждую сторону; отклонения вперед и назад — в пределах 15–17 см в каждую сторону; продолжительность занятия составляла 20 мин (13 мин прямо, 7 мин приставным шагом).

Перед включением в исследование всех пациентов подробно информировали о целях и сущности клинического исследования, методах диагностики и составляющих элементах реабилитационной программы, об эффективности исследования и безопасности, о пользе и степени риска при участии в исследовании, о своих правах и обязанностях. От всех пациентов, согласившихся принять участие в исследовании, получено добровольное письменное информированное согласие.

Этическая экспертиза протокола исследования (включая форму информированного согласия) выполнена ло-

кальным этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 163 от 20.03.2017). Члены локального этического комитета одобрили проведение исследования.

Для обработки полученных результатов была сгенерирована база данных в среде Microsoft Excel 2007. База данных включала 24 показателя для 72 пациентов. Значения показателей вносили в базу до курса реабилитации, в середине (после 10-й процедуры) и после него, за исключением значений ЭНМГ-исследования, которое проводилось дважды (до и после курса реабилитации). Обработку полученных результатов проводили с помощью пакета статистических программ StatSoft Statistica 10.0. Проверку наблюдений на нормальность проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Выборки не имели нормального распределения, поэтому применяли критерии Манна–Уитни, Вилкоксона, Фридмана. Для выявления статистических различий между основной группой и группой сравнения использовали критерий Манна–Уитни. Показатели сравнивали три раза: до проведения курса реабилитации, после 10-й процедуры и после окончания курса реабилитации. Для выявления статистических различий по показателям ЭНМГ-исследования до и после проведения курса реабилитации использовался критерий Вилкоксона для двух связанных выборок. Поскольку больные наблюдались в динамике в три разных момента времени отдельно для основной группы и группы сравнения использовали критерий Фридмана. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$. Если критерий Фридмана выявлял значимые различия по показателям в динамике, то для выяснения вопроса между какими временными срезами они были зафиксированы использовали критерий Вилкоксона. В критерии Вилкоксона множественные сравнения учитывали с помощью метода Бонферрони–Холма при определении критического уровня значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нейромиографическое исследование проводили при помощи электронейромиографа с компьютерной регистрацией и обработкой данных. Электромиограмма (ЭМГ) с мышц верхних (*m. opponens pollicis*) и нижних (*m. peroneus longus*) конечностей записывалась в состоянии покоя и при активном мышечном сокращении. Для анализа электромиограмм использовали классификацию Ю. С. Юсевич. В комплекс электронейромиографического исследования входило вычисление скорости проведения импульса по двигательным волокнам периферических нервов

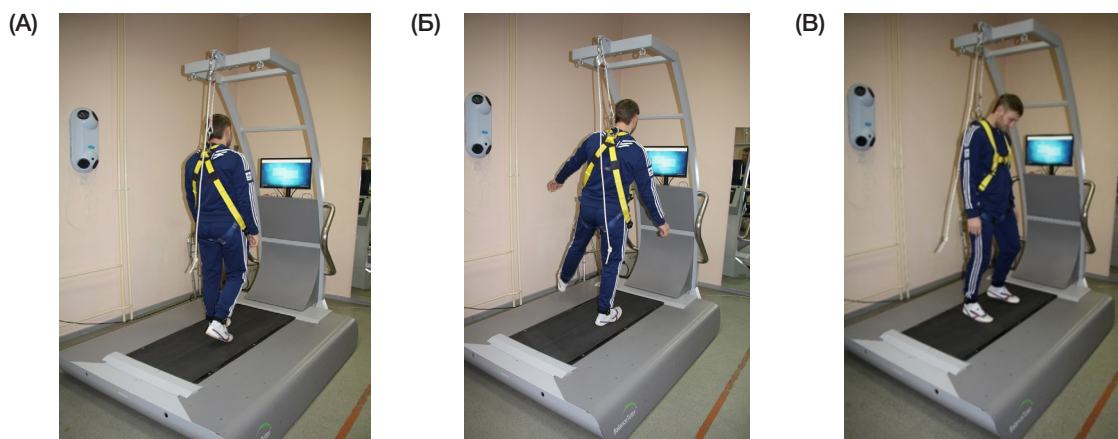


Рис. 2. Занятия на системе BalanceTutor

(*n. medianus*, *n. peroneus*), вычисление амплитуды, латентности и длительности моторного ответа в мышцах верхних и нижних конечностей.

При проведении ЭМГ у больных после ОНМК в пораженных конечностях было выявлено снижение электрогенеза исследованных мышечных групп (*m. opponens pollicis*, *m. peroneus longus*) в виде уменьшения амплитуды био-потенциалов по сравнению с нормальными величинами практически в два раза.

При анализе параметров ЭНМГ-исследования у больных с последствиями ОНМК выявлено снижение амплитуды моторного ответа на стороне пареза по срединному нерву в среднем на 50 %, до $1,73 \pm 0,6$ мВ, по малоберцовому нерву — на 40 %, до $2,09 \pm 0,8$ мВ.

Положительная динамика клинических проявлений у пациентов после ОНМК на стороне пареза в результате реабилитации совпадала с благоприятной динамикой нейрофизиологических данных. В группе больных, получавших реабилитацию с применением системы BalanceTutor, было зарегистрировано улучшение электронейромиографических, электромиографических показателей. После проведенного реабилитационного курса в основной группе с помощью ЭМГ выявлено увеличение амплитуды кривой максимального мышечного напряжения на стороне двигательных нарушений до $243,7 \pm 18,6$ мкВ в *m. opponens pollicis* и $447,26 \pm 24,7$ мкВ в *m. peroneus longus* (рис. 3). В

то время как амплитуда кривой максимального мышечного напряжения до реабилитации в этой группе составляла $181,9 \pm 17$ мкВ в *m. opponens pollicis* ($p = 0,0491$, критерий Вилкоксона) и $236,73 \pm 22$ мкВ в *m. peroneus longus* ($p = 0,0117$, критерий Вилкоксона). У 5 (13,5%) пациентов к окончанию курса реабилитации с применением системы BalanceTutor амплитуда на стороне поражения была сопоставима с показателями на здоровой стороне и составила $317,43 \pm 18,2$ мкВ для верхней конечности (*m. opponens pollicis*) и $538,23 \pm 24,2$ мкВ — для нижней (*m. peroneus longus*); в то время как до курса реабилитации у всех пациентов основной группы амплитуда кривой максимального мышечного напряжения была снижена. В группе сравнения амплитуда кривой максимального мышечного напряжения до реабилитации составила $178,92 \pm 19,0$ мкВ в *m. opponens pollicis* и $226,53 \pm 21,0$ мкВ в *m. peroneus longus*; после курса реабилитации амплитуда на стороне двигательных нарушений увеличилась до $197,3 \pm 18,1$ мкВ в *m. opponens pollicis* ($p = 0,0791$, критерий Вилкоксона) и $277,26 \pm 23,7$ мкВ в *m. peroneus longus* ($p = 0,0511$, критерий Вилкоксона). В обоих случаях статистически значимых различий не выявлено.

По данным ЭНМГ-исследования, в основной группе и группе сравнения значения скорости проведения импульса по двигательным волокнам, латентности, длительности моторного ответа после курса реабилитации не

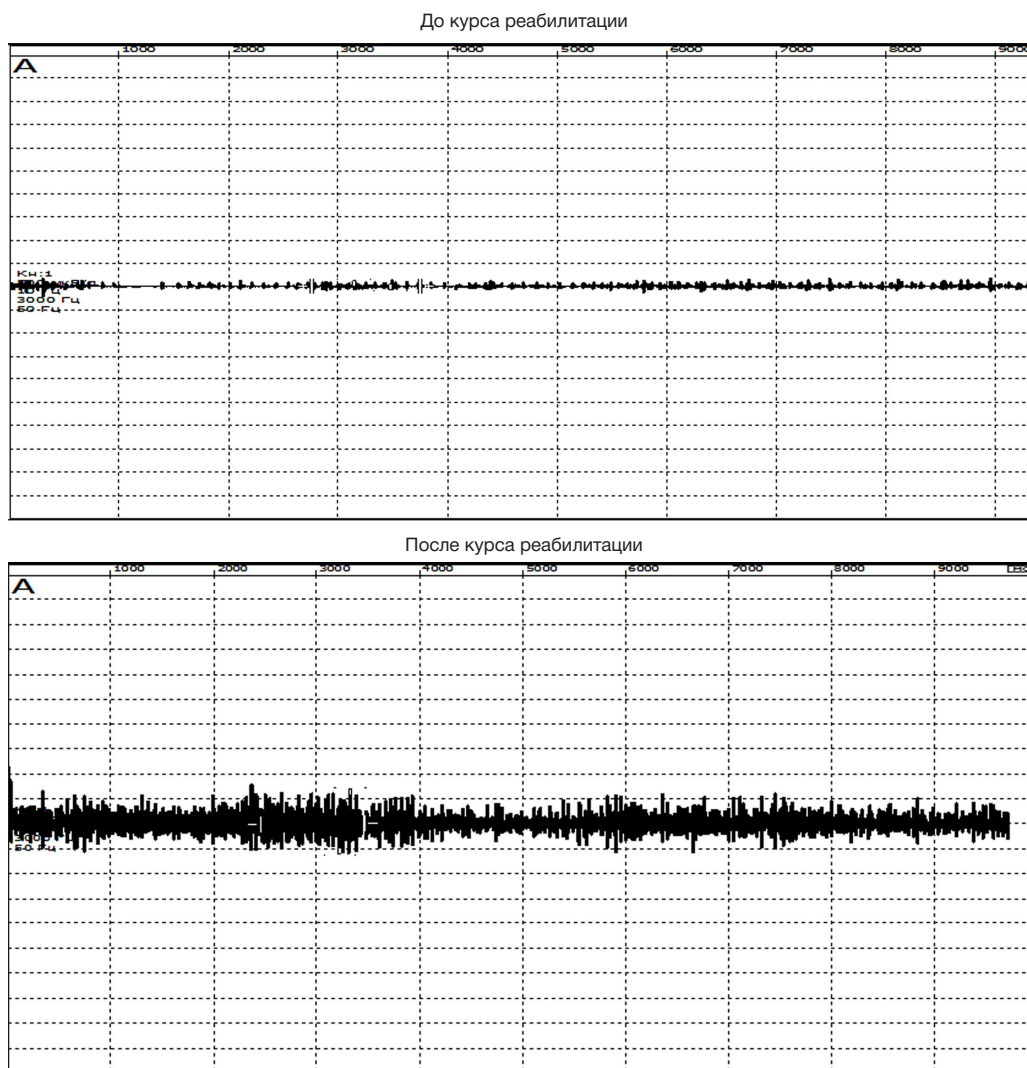


Рис. 3. Электромиограммы одного из пациентов основной группы с *m. peroneus longus* до и после курса реабилитации

отличались от таковых до курса реабилитации. В результате комплексной реабилитации пациентов с включением системы BalanceTutor отмечено увеличение амплитуды моторного ответа по срединному нерву с паретичной стороны до $2,54 \pm 0,9$ мВ, в группе сравнения — до $1,87 \pm 0,5$ мВ ($p = 0,0563$, критерий Манна–Уитни); перед началом курса реабилитации амплитуда моторного ответа по срединному нерву в основной группе составила $1,8 \pm 0,7$ мВ, в группе сравнения — $1,75 \pm 0,7$ мВ. К окончанию реабилитационного курса амплитуда моторного ответа по малоберцовому нерву в основной группе с паретичной стороны возросла до $2,97 \pm 0,9$ мВ, в группе сравнения — до $1,97 \pm 0,5$ мВ ($p = 0,0063$, критерий Манна–Уитни); до реабилитационного курса амплитуда моторного ответа по малоберцовому нерву в основной группе составляла $1,87 \pm 0,8$ мВ, в группе сравнения — $1,78 \pm 0,8$ мВ.

При проведении КС соблюдались все требования, установленные Московским консенсусом по применению стабилотрии и биоуправления по опорной реакции в практическом здравоохранении и исследованиях [16]. Диагностическое исследование проводили в положении пациента стоя на стабилотриформе двумя ногами с определением коэффициента Ромберга и оценкой следующих показателей: площади статокинезиограммы и скорости перемещения центра давления (ЦД) в положениях «глаза открыты» (ГО) и «глаза закрыты» (ГЗ). При анализе результатов КС до реабилитационного курса в обеих группах были выявлены наиболее выраженные отклонения от нормальных значений в положении ГО и ГЗ как площади статокинезиограммы, так и скорости перемещения ЦД. Площадь статокинезиограммы в положении ГО превысила норму и составила для пациентов основной группы $120,4 \pm 31,24$ мм², для группы сравнения — $123,16 \pm 34,87$ мм². Скорость перемещения ЦД в положении ГО также заметно превысила норму в обеих группах и составила $18,63 \pm 1,79$ мм/с у пациентов основной группы и $18,09 \pm 1,99$ мм/с у пациентов группы сравнения. Отклонение значений стабилотриметрических показателей от нормы значительно возросло в обеих группах при выключении зрительного контроля. В положении ГЗ зафиксировано увеличение площади статокинезиограммы: $254,5 \pm 27,5$ мм² в основной группе и $269,86 \pm 32,71$ мм² в группе сравнения; и скорости смещения ЦД: $28,25 \pm 2,56$ мм/с в основной группе и $29,61 \pm 4,03$ мм/с в группе сравнения. Функциональное состояние обследованных пациентов до курса реабилитации характеризовалось снижением стабильности баланса тела в вертикальном положении. Высокие значения коэффициента Ромберга — $211,37 \pm 16,24$ % в основной группе и $219,11 \pm 20,31$ % в группе сравнения — свидетельствовали о недостаточном контроле со стороны проприоцептивной системы, в связи с чем больший удельный вес в поддержании баланса тела приходился на зрительную систему. В середине курса реабилитации определен вектор положительной направленности показателей площади статокинезиограммы и скорости перемещения ЦД в положениях ГО и ГЗ, коэффициента Ромберга в обеих группах без регистрации статистически значимых различий.

После курса реабилитации с применением системы BalanceTutor отмечен положительный вектор в изменении стабилотриметрических показателей. Уменьшение площади статокинезиограммы в положении ГО наблюдали в обеих группах, но с более выраженной динамикой в основной группе: $82,3 \pm 21,43$ мм² в основной группе и

$115,4 \pm 31,56$ мм² в группе сравнения; $p = 0,0476$, критерий Манна–Уитни. Статистически значимые изменения площади статокинезиограммы отмечены в положении ГЗ с более значимым результатом в основной группе: $160,45 \pm 24,63$ мм² в основной группе и $247,58 \pm 41,39$ мм² в группе сравнения; $p = 0,0072$, критерий Манна–Уитни. Это является очевидным показателем возрастания роли проприоцептивной системы в удержании вертикального положения и некоторого улучшения функции зрительно-моторной связи. Вышеуказанные данные подтверждают тенденцией к уменьшению значений коэффициента Ромберга к окончанию реабилитационного курса с более заметной положительной динамикой в основной группе: $194,91 \pm 21,62$ % в основной группе, $214,54 \pm 19,74$ % в группе сравнения; $p = 0,0798$, критерий Манна–Уитни, различия статистически не значимы. К окончанию курса реабилитации выявлена положительная динамика изменения скорости ЦД в обеих группах. Однако статистически значимое изменение в виде уменьшения скорости ЦД определено в основной группе: в положении ГО скорость перемещения ЦД составила $11,09 \pm 1,06$ мм/с, а в группе сравнения $17,05 \pm 1,42$ мм/с ($p = 0,0176$, критерий Манна–Уитни); в положении ГЗ скорость смещения ЦД равнялась $18,09 \pm 2,08$ мм/с в основной группе и $27,91 \pm 4,5$ мм/с в группе сравнения ($p = 0,0037$, критерий Манна–Уитни). Уменьшение скорости перемещения ЦД после завершения реабилитационного курса свидетельствует об улучшении статического равновесия и увеличении устойчивости пациентов, причем преимущественно в основной группе.

Динамику изменения мышечной силы и степени пареза оценивали с помощью 6-балльной шкалы (по McPeak; Вейсс). После курса реабилитации у пациентов обеих групп зафиксировали увеличение мышечной силы в конечностях, что подтверждалось увеличением количества пациентов, перешедших из группы с умеренным парезом в группу с легким парезом. Достоверные изменения отмечены в основной группе в отношении мышечной силы пораженной нижней конечности. В основной группе после курса реабилитации парез легкой степени выраженности в нижних конечностях выявлен у 33 (89,2 %) пациентов, что статистически значимо ($p = 0,0247$, критерий хи-квадрат с поправкой Йейтса) отличалось от аналогичного показателя в группе сравнения — 18 (51,4 %). До реабилитационного курса парез легкой степени в нижних конечностях фиксировался у 13 (35,1 %) пациентов основной группы и у 12 (34,3 %) пациентов группы сравнения; парез средней степени — у 24 (64,9 %) пациентов основной группы и у 23 (65,7 %) — группы сравнения. В верхней конечности на стороне пареза отмечена лишь тенденция к увеличению мышечной силы с небольшим превосходством в основной группе. В середине курса реабилитации у пациентов обеих групп отмечена тенденция к увеличению мышечной силы в пораженных конечностях с превосходством показателей мышечной силы в нижней конечности у пациентов основной группы (рис. 4).

Комплексная реабилитация пациентов с нарушением постурального баланса после ОНМК способствовала изменению показателей мышечного тонуса в паретичных конечностях, которые определяли с помощью шкалы спастичности Ашфорта (по Bohannon, Smith; Wade). До начала реабилитационных мероприятий у пациентов обеих групп значения спастичности в пораженных конечностях соответствовали умеренному повышению тонуса: средний балл мышечного тонуса для верхней конечности в основной группе составил $3,25 \pm 0,48$, в группе

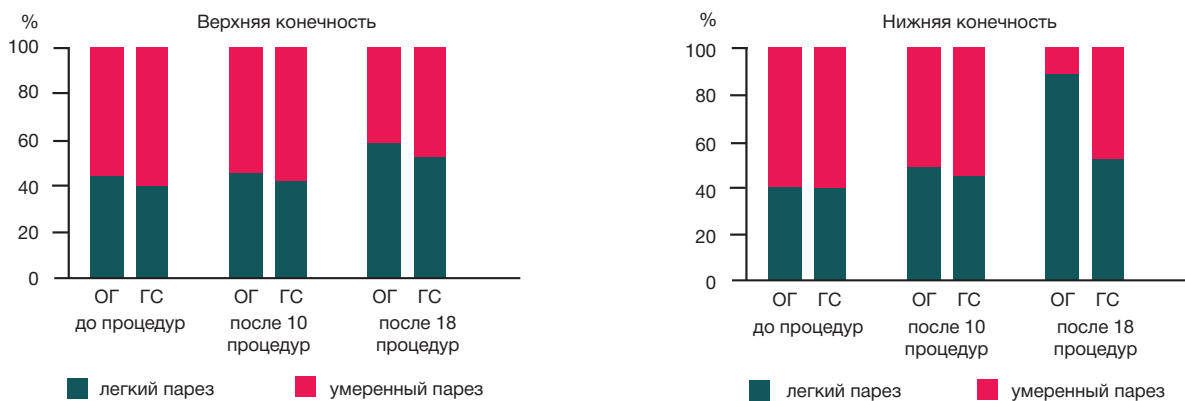


Рис. 4. Распределение пациентов основной группы (ОГ) и группы сравнения (ГС) по степени выраженности пареза конечностей на этапах реабилитации

сравнения — $3,31 \pm 0,53$; для нижней конечности в основной группе — $3,04 \pm 0,38$ и в группе сравнения — $3,11 \pm 0,42$. После 10-й процедуры отмечена незначительная тенденция к уменьшению спастичности в пораженных конечностях обеих групп. К выписке пациентов из реабилитационного центра в обеих группах зафиксировано изменение мышечного тонуса в пораженных конечностях в виде его снижения со статистически значимой динамикой в основной группе преимущественно в нижней конечности ($p = 0,0041$, критерий Фридмана): для нижней конечности средний балл мышечного тонуса составил $2,29 \pm 0,23$ в основной группе и $2,82 \pm 0,39$ в группе сравнения; для верхней — $2,88 \pm 0,38$ и $2,93 \pm 0,41$ соответственно.

Функциональная шкала Тинетти позволила оценить успешность выполнения статических и динамических двигательных заданий и степень имеющихся нарушений равновесия. При поступлении в реабилитационный стационар зафиксированы изменения показателей походки и устойчивости в основной группе — $11,42 \pm 0,26$ и $15,87 \pm 0,31$ балла соответственно и в группе сравнения — $11,38 \pm 0,28$ и $15,58 \pm 0,34$ балла, что сопоставимо с умеренной степенью выраженности нарушений в обеих группах. В середине курса реабилитации определен вектор положительной направленности показателей походки и устойчивости в обеих группах без регистрации статистически значимых различий. К окончанию реабилитационного курса функциональная шкала Тинетти позволила выявить положительные изменения в обеих группах с более выраженной динамикой в сторону изменения показателей, соответствующих легкой степени нарушений в основной группе: показатель походки — $14,97 \pm 0,28$ балла ($p = 0,0513$, критерий Вилкоксона); устойчивости — $21,9 \pm 0,37$ балла ($p = 0,0274$, критерий Вилкоксона). Улучшились показатели походки и устойчивости и у пациентов группы сравнения, однако, они не превысили значений, соответствующих умеренным нарушениям: $12,02 \pm 0,29$ балла ($p = 0,0931$, критерий Вилкоксона) и $17,02 \pm 0,27$ балла ($p = 0,0671$, критерий Вилкоксона) соответственно. В обоих случаях статистически значимых различий не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последние годы были проведены исследования, в ходе которых применяли методики с включением стабилметрической платформы и виртуальной реальности, направленные на восстановление статического равновесия у пациентов после ОНМК. Возможности подобных методик позволяют корректировать только статическое равновесие, что определяет необходимость использования

методов восстановления динамического равновесия. Тем не менее эффективность их применения была доказана изменением показателей КС в виде уменьшения значений площади статокинезиограммы с $802,61$ до $799,36$ мм² ($p = 0,0034$) и скорости перемещения центра давления с $18,61$ до $16,53$ мм/с ($p = 0,414$) [4, 17]. После координаторных тренировок было определено увеличение показателей устойчивости по шкале Тинетти с $15,33 \pm 0,65$ до $19,69 \pm 0,73$ балла ($p < 0,05$) [18]. В то же время была использована онтогенетически обусловленная кинезотерапия, что повлекло за собой изменение ЭМГ-картины в виде регистрации своеобразного дискоординационного синдрома, выявляемого при постинсультных двигательных расстройствах в большинстве мышц и проявляющегося асимметрией мышечной активности при симметричных движениях [19]. По данным электронейромиографического обследования было отмечено увеличение максимальной амплитуды мышечного ответа в *m. soleus* на стороне поражения с $399,9 \pm 33,8$ мВ до $420,9 \pm 37,7$ мВ, амплитуды моторного ответа *n. tibialis* с $6,49 \pm 0,25$ мВ до $6,69 \pm 0,3$ мВ на фоне применения дифференцированной лечебной гимнастики [20].

Включение в комплексную реабилитацию методики тренировки с использованием системы BalanceTutor, которая позволяет корректировать как статическое, так и динамическое равновесие, расширяет возможности реабилитационного процесса, поскольку координаторные занятия проводятся не только в положении стоя, но и во время ходьбы путем инициации неожиданного пострального возмущения за счет дестабилизирующего воздействия с изменяемой амплитудой в различных режимах движения. В результате проведенного исследования показано, что полученные данные превосходят по значениям показатели стабилметрического исследования и функционального тестирования, представленные ранее в литературе при баланс-тренинге в статике. Система BalanceTutor является новой для российской системы реабилитации и была введена в эксплуатацию в нашей стране только в 2016 г., исследование выполнено впервые как в России, так и за рубежом, что не позволяет провести сравнительный анализ результатов использования данной системы у больных с ОНМК.

ВЫВОДЫ

Анализ полученных данных позволяет полагать цель, сформулированную в начале исследования, достигнутой, что подтверждается данными объективных исследований и цифровыми значениями результатов оценки с

использованием шкал. На фоне применения предлагаемой методики у пациентов после острого нарушения мозгового кровообращения на стороне пареза отмечено изменение кривой электромиографического исследования в виде увеличения амплитуды максимального мышечного напряжения, преимущественно в пораженной нижней конечности, а также показателей электронейромиографического исследования в виде увеличения амплитуды моторного ответа в большей степени по малоберцовому нерву.

Улучшение статического равновесия и увеличение устойчивости пациентов с ОНМК подтверждается уменьшением показателей площади статокинезиограммы и скорости перемещения центра давления, преимущественно в основной группе, как в положении «глаза открыты», так и в положении «глаза закрыты»; уменьшение значений коэффициента Ромберга свидетельствует об увеличении роли проприоцептивной системы в удержании вертикальной позы.

Показатели устойчивости и походки у пациентов основной группы после реабилитации возросли до значений, соответствующих легкой степени нарушений по шкале Ти-

нетти (в группе сравнения указанные показатели остались в пределах значений, соответствующих умеренным нарушениям).

После курса реабилитации отмечена положительная динамика показателей шкал оценки мышечной силы и мышечного тонуса преимущественно в нижней конечности со стороны пареза у больных основной группы. К окончанию курса процедур отмечено увеличение количества пациентов с легкой степенью пареза в нижней конечности в основной группе практически в 2 раза относительно аналогичных пациентов группы сравнения. До реабилитационного курса число пациентов с легкой и умеренной степенью выраженности пареза в нижней конечности было сопоставимо в обеих группах. К концу стационарного лечения спастичность в нижней конечности со стороны пареза в основной группе уменьшилась практически в 1,5 раза относительно группы сравнения.

Проведенное исследование показало эффективность применения и целесообразность включения системы BalanceTutor в комплексную реабилитацию пациентов после ОНМК, имеющих статолокомоторные нарушения.

Литература

1. Гусарова С. А., Стяжкина Е. М., Гуркина М. В., Чесникова Е. И., Сычева А. Ю. Новые технологии кинезитерапии в реабилитации пациентов с постинсультными двигательными нарушениями. *Вопр. курортол., физиотер. и леч. физ. культ.* 2016; 93 (2): 4–8.
2. Даминов В. Д. Роботизированная локомоторная терапия в нейрореабилитации. *Вестн. восстановит. мед.* 2012; 47 (1): 54–9.
3. Разумов А. Н., Мельникова Е. А. Современные подходы к индивидуальному прогнозированию восстановления больных с инсультом в процессе реабилитации: обзор литературы и результаты собственного исследования. *Вопр. курортол., физиотер. и леч. физ. культ.* 2015; 92 (6): 11–6.
4. Прокопенко С. В., Ондар В. С., Аброськина М. В. Синдром центрального гемипареза и нарушение равновесия. *Вестн. восстановит. мед.* 2012; 51 (5): 23–8.
5. McCombe Waller S, Prettyman MG. Arm training in standing also improves postural control in participants with chronic stroke. *Gait Posture.* 2012 Jul; 36 (3): 419–24.
6. Mao Y, Chen P, Li L, Huang D. Virtual reality training improves balance function. *Neural Regen Res.* 2014 Sep 1; 9 (17): 1628–34.
7. Crenshaw JR, Kaufman KR. The intra-rater reliability and agreement of compensatory stepping thresholds of healthy subjects. *Gait Posture.* 2014 Feb; 39 (2): 810–5.
8. Inness EL, Mansfield A, Biasin L, Brunton K, Bayley M, Mcllroy WE. Clinical implementation of a reactive balance control assessment in a sub-acute stroke patient population using a “lean-and-release” methodology. *Gait Posture.* 2015 Feb; 41 (2): 529–34.
9. Inness EL, Mansfield A, Lakhani B, Bayley M, Mcllroy WE. Impaired reactive stepping among patients ready for discharge from inpatient stroke rehabilitation. *Phys Ther.* 2014 Dec; 94 (12): 1755–64.
10. Lakhani B, Mansfield A, Inness EL, Mcllroy WE. Compensatory stepping responses in individuals with stroke: a pilot study. *Physiother Theory Pract.* 2011 May; 27 (4): 299–309.
11. Mansfield A, Inness EL, Lakhani B, Mcllroy WE. Determinants of limb preference for initiating compensatory stepping poststroke. *Arch Phys Med Rehabil.* 2012 Jul; 93 (7): 1179–84.
12. Mansfield A, Inness EL, Wong JS, Fraser JE, Mcllroy WE. Is impaired control of reactive stepping related to falls during inpatient stroke rehabilitation? *Neurorehabil Neural Repair.* 2013 Jul–Aug; 27 (6): 526–33.
13. Sibley KM, Straus SE, Inness EL, Salbach NM, Jaglal SB. Balance assessment practices and use of standardized balance measures among Ontario physical therapists. *Phys Ther.* 2011 Nov; 91 (11): 1583–91.
14. Воловец С. А., Сергеенко Е. Ю., Даринская Л. Ю., Яшинина Ю. А., Рубейкин И. С., Житарева И. В. и др. Методика восстановления постурального баланса у пациентов после острого нарушения мозгового кровообращения на основе использования системы для восстановления статического и динамического равновесия. В сб.: *Избранные вопросы нейрореабилитации [электронная версия]: Материалы IX международного конгресса «Нейрореабилитация-2017»;* 1–2 июня 2017 г.; Москва, Россия. М.; 2017. с. 45–7; [дата обращения: 30 июня 2017 г.] Доступно по: http://congress-neuro.ru/sites/default/files/Materials_NR2017.pdf
15. Воловец С. А., Сергеенко Е. Ю., Даринская Л. Ю., Яшинина Ю. А., Рубейкин И. С. Способ реабилитации пациента с нарушением постурального баланса. Заявка на патент на изобретение Российской Федерации RU 2016138709. 30 сентября 2016 г.
16. Московский консенсус по применению стабилотрии и биоуправления по опорной реакции в практическом здравоохранении и исследованиях [Интернет]. М.: НИИ нормальной физиологии имени П. К. Анохина; ©2017 [дата обращения: 30 июня 2017 г.]; 10 с. Доступно по: <http://moscowstabilometryconsensus.ru>
17. Шишкина Е. С., Бейн Б. Н. Динамика устойчивости пациентов, перенесших ишемический инсульт в каротидном и вертебрально-базилярном бассейнах. *Мед. альманах.* 2014; 33 (3): 45–9.
18. Ястребцева И. П. Патогенез формирования нарушений постурального баланса при инсульте и алгоритм их коррекции. В кн.: *Ильинских Н. Н., редактор. Фундаментальные науки и практика: сборник научных трудов.* Томск: СибГМУ; 2010. 1 (4): 37.
19. Скворцов Д. В., Булатова М. А., Ковражкина Е. А., Суворов А. Ю., Иванова Г. Е., Скворцова В. И. Комплексное исследование биомеханики движений у пациентов с постинсультными гемипарезами. *Журн. неврол. и психиатр.* 2012; 112 (6): 45–9.
20. Пеленицына Е. М. Электромиографические критерии эффективности применения различных методов лечебной физкультуры у больных с церебральным инсультом [диссертация]. М.: РГМУ; 2004.

References

- Gusarova SA, Styazhkina EM, Gurkina MV, Chesnikova EI, Sycheva AYU. [The new technologies of kinesiotherapy for the rehabilitation of the patients suffering from the post-stroke locomotor disorders]. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult.* 2016 Mar-Apr; 93 (2): 4–8. Russian.
- Daminov VD. Robotizirovannaya lokomotornaya terapiya v neyroreabilitatsii. *Vestnik vosstanovitel'noy meditsiny.* 2012; 47 (1): 54–9. Russian.
- Razumov AN, Melnikova EA. [The modern approaches to the prognostication of rehabilitation of the patients after stroke on an individual basis: a review of the literature and the results of original investigations]. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult.* 2015 Nov-Dec; 92 (6): 11–6. Russian.
- Prokopenko SV, Ondar VS, Abros'kina MV. Sindrom tsentral'nogo gemipareza i narushenie ravnovesiya. *Vestnik vosstanovitel'noy meditsiny.* 2012; 51 (5): 23–8. Russian.
- McCombe Waller S, Prettyman MG. Arm training in standing also improves postural control in participants with chronic stroke. *Gait Posture.* 2012 Jul; 36 (3): 419–24.
- Mao Y, Chen P, Li L, Huang D. Virtual reality training improves balance function. *Neural Regen Res.* 2014 Sep 1; 9 (17): 1628–34.
- Crenshaw JR, Kaufman KR. The intra-rater reliability and agreement of compensatory stepping thresholds of healthy subjects. *Gait Posture.* 2014 Feb; 39 (2): 810–5.
- Inness EL, Mansfield A, Biasin L, Brunton K, Bayley M, Mcllroy WE. Clinical implementation of a reactive balance control assessment in a sub-acute stroke patient population using a “lean-and-release” methodology. *Gait Posture.* 2015 Feb; 41 (2): 529–34.
- Inness EL, Mansfield A, Lakhani B, Bayley M, Mcllroy WE. Impaired reactive stepping among patients ready for discharge from inpatient stroke rehabilitation. *Phys Ther.* 2014 Dec; 94 (12): 1755–64.
- Lakhani B, Mansfield A, Inness EL, Mcllroy WE. Compensatory stepping responses in individuals with stroke: a pilot study. *Physiother Theory Pract.* 2011 May; 27 (4): 299–309.
- Mansfield A, Inness EL, Lakhani B, Mcllroy WE. Determinants of limb preference for initiating compensatory stepping poststroke. *Arch Phys Med Rehabil.* 2012 Jul; 93 (7): 1179–84.
- Mansfield A, Inness EL, Wong JS, Fraser JE, Mcllroy WE. Is impaired control of reactive stepping related to falls during inpatient stroke rehabilitation? *Neurorehabil Neural Repair.* 2013 Jul-Aug; 27 (6): 526–33.
- Sibley KM, Straus SE, Inness EL, Salbach NM, Jaglal SB. Balance assessment practices and use of standardized balance measures among Ontario physical therapists. *Phys Ther.* 2011 Nov; 91 (11): 1583–91.
- Volovets SA, Sergeenko EYu, Darinskaya LYu, Yashinina YuA, Rubeykin IS, Zhitareva IV, et al. Metodika vosstanovleniya postural'nogo balansa u patsientov posle ostrogo narusheniya mozgovoogo krovoobrashcheniya na osnove ispol'zovaniya sistemy dlya vosstanovleniya staticheskogo i dinamicheskogo ravnovesiya. In: *Izbrannye voprosy neyroreabilitatsii [electronic edition]: Materialy IX mezhdunarodnogo kongressa «Neyroreabilitatsiya-2017»;* 2017 Jun 1–2; Moscow, Russia. Moscow; 2017. p. 45–7; [cited 2017 Jun 30] Available from: http://congress-neuro.ru/sites/default/files/Materials_NR_2017.pdf Russian.
- Volovets SA, Sergeenko EYu, Darinskaya LYu, Yashinina YuA, Rubeykin IS. Sposob reabilitatsii patsienta s narusheniem postural'nogo balansa. Russian patent application RU 2016138709. 2016 Sept 30. Russian.
- Moscow Consensus on applying of stabilometry and biosteering for the footing reaction in practical health and research [Internet]. Moscow: P Kh Anokhin Science and research institute for normal physiology; c2017 [cited 2017 Jun 30]; 10 p. Available from: <http://moscowstabilometryconsensus.ru> Russian.
- Shishkina ES, Beyn BN. [Persistence dynamics of patients who suffered from ischemic stroke in carotid and vertebrobasilar territories]. *Medicinskij al'manah.* 2014; 33 (3): 45–9. Russian.
- Yastrebtseva IP. Patogenez formirovaniya narusheniy postural'nogo balansa pri insul'te i algoritm ikh korrektsii. In: *Il'inskikh NN, editor. Fundamental'nye nauki i praktika: sbornik nauchnykh trudov.* Tomsk: SSMU; 2010. 1 (4): 37. Russian.
- Skvortsov DV, Bulatova MA, Kovrazhkina EA, Suvorov Alu, Ivanova GE, Skvortsova VI. [A complex study of the movement biomechanics in patients with post-stroke hemiparesis]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 2012; 112 (6): 45–9. Russian.
- Pelenitsyna EM. Elektromiograficheskie kriterii effektivnosti primeneniya razlichnykh metodov lechebnoy fizkul'tury u bol'nykh s tserebral'nym insul'tom [dissertation]. Moscow: RSMU; 2004. Russian.

РОЛЬ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО СТАТУСА МАТЕРИ В ИЗМЕНЕНИИ ГЕНОТИП-СРЕДОВЫХ СООТНОШЕНИЙ В СТРУКТУРЕ ЯЗЫКОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК

Д. Н. Чернов ✉

Кафедра общей психологии и педагогики, психолого-социальный факультет,
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Изучение роли средовых факторов в изменении генотип-средовых соотношений по психологическим характеристикам является актуальной задачей современной психогенетики. Важнейший фактор изменения генотип-средовых соотношений по когнитивным способностям — социоэкономический, и в частности образовательный, статус родителей. Исследовались причины фенотипических взаимосвязей между субтестами Гейдельбергского теста речевого развития ребенка путем подсчета генотипических и средовых корреляций между одноименными характеристиками. Анализ проводился раздельно в подгруппах детей из семей со средним и высоким образовательным статусом их матерей. Применяли близнецовый метод: в подгруппу близнецов из семей со средним образовательным статусом матерей вошли 17 монозиготных и 11 дизиготных пар; подгруппу детей из семей с высоким образовательным статусом матерей составили 17 монозиготных и 22 дизиготных пары. Возраст детей — 7 лет — 8 лет 11 мес. На основании анкетных данных показано, что образовательный статус связан с субъектной активностью матерей в вопросах индивидуализации воспитания близнецов в паре. В семьях с высоким образовательным статусом матерей эта установка приводит к возрастанию уровня языкового развития детей, росту структурной связанности различных языковых характеристик, увеличению удельного веса общего генотипического фактора и снижению роли общесемейной среды в объяснении природы этой структурной связанности.

Ключевые слова: близнецовый метод, генетическая корреляция, образовательный статус, психогенетика, социоэкономический статус, средовая корреляция, языковая компетенция

✉ **Для корреспонденции:** Чернов Дмитрий Николаевич
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; chernov_dima@mail.ru

Статья получена: 14.04.2017 **Статья принята к печати:** 07.05.2017

THE ROLE OF MATERNAL EDUCATION IN REGULATING GENETIC AND ENVIRONMENTAL CONTRIBUTIONS TO THE DEVELOPMENT OF CHILD'S LANGUAGE COMPETENCIES

Chernov DN ✉

Department of General Psychology and Pedagogy, Faculty of Psychology and Sociology,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Understanding the role of the environment in the dynamics of gene-environment interactions shaping psychological traits of the child is one of the central issues of contemporary psychogenetics. The socioeconomic status of the parents (education in particular) is a critical factor regulating the share of environmental and genetic influences on the child's cognitive abilities. This work is a study of phenotypic associations between the results of the subtests of the Heidelberg Speech Development Test designed to measure children's speech and language competence, by computing genotypic and environmental correlations between its components. Children were divided into groups based on the educational level of their mothers (medium and high); each group was analyzed separately. For our analysis we used the twin method: the group of twins born to mothers with medium-level education included 17 monozygotic and 11 dizygotic twin pairs; the group of children born to highly educated mothers was comprised of 17 monozygotic and 22 dizygotic twin pairs. All children were aged from 7 years to 8 years and 11 months. Family report forms revealed an association between maternal education and individualized approach to the upbringing of each of the twins. It was shown that in families with highly educated mothers, differences in the upbringing strategies improve the development of language and speech competencies of the child, strengthen the relationship between various language competencies, increase the contribution of the genotype to and decrease the role of the general family environment in this relationship.

Keywords: twin method, genetic correlation, education, psychogenetics, socioeconomic status, environmental correlation, language competence

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry Chernov
ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997; chernov_dima@mail.ru

Received: 14.04.2017 **Accepted:** 07.05.2017

Социоэкономический статус (СЭС) родителей вносит существенный вклад в возникновение индивидуальных различий у детей по различным психологическим характеристикам. Составляющими СЭС являются доход семьи, образовательный и профессиональный статус родителей. Создание благоприятных для развития детей условий в семьях с высоким СЭС происходит по нескольким направлениям. Расширяются возможности получения детьми качественного питания, высокого уровня медицинского обслуживания; семьи имеют возможность выбирать экологические более полноценные жилищные условия; для детей создается когнитивно-стимулирующая среда; детско-родительские отношения характеризуются гармоничностью и позитивными установками относительно развития ребенка [1]. В нашей стране выделение групп для исследований по критерию СЭС на основании анкет оказывается проблематичным: родители предпочитают в обобщенной форме давать характеристику материальному положению семьи. Разделение групп по критерию «образовательный статус» (ОС) родителей оказывается продуктивным способом изучения вклада фактора СЭС в индивидуальные психологические различия [2].

СЭС родителей является фактором возникновения индивидуальных различий по языковым характеристикам. Связь СЭС родителя с показателями развития языка у ребенка обнаруживается в возрасте 1,5 лет. К трехлетнему возрасту СЭС и уровень образования матери положительно связаны с размером и разнообразием активного словаря и пониманием языка; средней длиной высказывания в морфемах; разнообразием в речи словосочетаний, сложносочиненных и сложноподчиненных конструкций [3–7]. В дошкольном и школьном возрастах дети из семей с высоким СЭС обладают большим словарным запасом, используют в речи грамматически и синтаксически более сложные предложения и достигают значительных успехов в овладении навыками чтения, лучше справляются с вербальными задачами, чем сверстники из семей с низким СЭС [5, 8–11].

Родители с высокими СЭС и ОС создают благоприятную для языкового развития детей развивающую домашнюю среду. Такие матери вербально отзывчивы, больше общаются со своими детьми и побуждают их к общению, дольше держат тему беседы, меньше используют директивные формы высказываний и более непосредственно реагируют на высказывания детей. Их речь богата по лексическому и грамматическому составу и содержит больше информации об окружающих объектах. Количество времени, которое уделяют детско-родительскому взаимодействию матери с высоким СЭС, имеет столь же важное значение для языкового развития ребенка, как и усредненные характеристики речи матерей. Межгрупповые различия в объеме активного словаря у детей раннего возраста из семей с разным СЭС почти полностью исчерпываются степенью насыщенности языковой среды [5, 12–14]. Вместе с тем при учете лексической и синтаксической сложности речи матери в качестве независимого от СЭС фактора роль последнего в возникновении межиндивидуальных различий по разнообразию слов и словосочетаний, используемых в речи, у детей в возрасте 1–4 года снижается [6]. Улучшение развивающей домашней среды в семьях с низким СЭС оказывает благотворное влияние на развитие языковых способностей [15, 16]. Уровень образования и доход матери и отца, обуславливая особенности взаимодействия с ребенком, вносят относительно самостоятельный вклад в языковое развитие ребенка в

1,5–3 года [17, 18]. Результаты исследований дают основания полагать, что СЭС родителей является коррелятом уровня субъектной активности родителей по улучшению развивающей языковой среды детей.

Эти исследования позволяют понять вклад СЭС семьи как средового фактора в изменчивость языковых характеристик. Однако межиндивидуальную вариативность по языковым характеристикам помимо средовых факторов создают и генетические. На вопрос о роли наследственных и средовых факторов и их взаимодействия в формировании индивидуальных различий по психологическим характеристикам отвечает пограничная между психологией и генетикой область знания — психогенетика [19]. Исследования природы межиндивидуальной изменчивости по характеристикам языкового развития показывают, что она формируется за счет влияния средовых и генетических факторов [20].

Важной линией анализа психогенетических исследований является изучение роли средовых факторов в изменении генотип-средовых соотношений. Исследователи опираются на положения биоэкологической модели Бронфенбреннера и Сеси, в которой предполагается, что высокий уровень развивающих ресурсов, создаваемый ближайшим социальным окружением ребенка, оказывает долговременный эффект на вклад дистальных средовых ресурсов (система образования, культура, экономика) в развитие ребенка и может влиять на экспрессию генетических диспозиций развития [21]. Скарр полагает, что характеристики среды могут опосредовать соотношение вкладов генетических и средовых факторов в формирование межиндивидуальной вариативности по психологическим характеристикам [22].

В соответствии с этими предположениями в раннем онтогенезе индивидуальные различия, например, по когнитивным характеристикам должны испытывать значительное влияние факторов общесемейной, разделяемой всеми членами семьи среды; с возрастом вклад наследственных факторов в вариативность оценок познавательных способностей возрастает, а удельный вес факторов общесемейной среды снижается. Обнаружено, что СЭС опосредует генотип-средовые соотношения по характеристикам интеллектуального развития детей. Так, у двухлетних детей из семей с низким СЭС различия по общему интеллекту объясняются влияниями общесемейной среды. У детей из семей с высоким СЭС на фоне возрастания общего уровня интеллектуального развития происходит изменение генотип-средовых соотношений в сторону увеличения вклада наследственных факторов в индивидуальные различия [23, 24]. У семилетних детей из семей с высоким СЭС более половины фенотипической дисперсии оценок общего интеллекта объясняется влияниями наследственных факторов; у детей из семей с низким СЭС родителей около 60 % индивидуальных различий определяется влияниями общесемейной среды [25]. Похожие результаты получены в психогенетических исследованиях вербального интеллекта, но только в школьном возрасте [26]. В раннем и дошкольном возрастах СЭС семьи в незначительной степени определяет изменение генотип-средовых соотношений по вербальному интеллекту [27].

Хотя в большинстве исследований опосредующий эффект СЭС в изменении генотип-средовых соотношений по когнитивным характеристикам подтверждается, в ряде работ эффект отсутствует. Объяснение противоречиям дают Такер-Дроб и Бейтс. Проведя метаанализ 14 работ, касающихся роли СЭС в опосредовании генотип-средовых

соотношений в индивидуальных различиях по интеллекту и академической успеваемости, они обнаружили эффект опосредования в работах, выполненных на выборках американских детей. Эффекта не наблюдалось в исследованиях, проведенных в Западной Европе и Австралии. Авторы указывают, что нулевой или даже обратный эффект опосредования объясняется социальной политикой в этих странах, где обеспечивается более равномерный доступ к качественному образованию и здравоохранению всем слоям населения [28].

Относительно генотип-средовых соотношений по языковым способностям обнаружено, что фактор СЭС семьи в дошкольном возрасте в незначительной степени детерминирует их изменение. Наряду с фактором упорядоченности домашней обстановки ребенка, СЭС определяет только 3–5 % индивидуальных различий при 52–58 % обусловленности вербальных способностей детей со стороны каких-то иных факторов разделенной среды [29, 30]. При исследовании этиологии индивидуальных различий в понимании речи при чтении у восьмилетних детей обнаружено, что при существенной генетической обусловленности индивидуальных различий вклад наследственности растет с увеличением СЭС школы (производная от СЭС семей учеников), в которых обучались испытуемые. Однако только 7,5 % индивидуальных различий в понимании при чтении вовлечены в генотип-средовую корреляцию с СЭС школы [31]. ОС родителей оказывает влияние на изменение генотип-средовых соотношений в младшем школьном и подростковом возрастах. Сопоставление генотип-средовых соотношений, полученных по выборкам российских школьников из семей с высоким и средним ОС их матерей, показывает, что индивидуальные различия по оценкам владения русским языком объясняются воздействием различных факторов: в первой выборке вклад наследственных факторов в межиндивидуальную вариативность оценок, как правило, значительно выше, чем во второй. В свою очередь, в выборке детей из семей со средним ОС матерей индивидуальные различия по языковым характеристикам в существенной степени объясняются воздействием преимущественно общесредовых факторов [32]. На подростковой выборке получено, что у детей из семей с высоким ОС родителей индивидуальные особенности понимания языка в существенной степени обусловлены генетическими факторами. У детей из

семей с низким уровнем образования родителей вклад наследственных и общесемейных факторов в формирование межиндивидуальных различий одинаково мал [33]. В двух исследованиях способностей, связанных с чтением и языком, проведенных на контингенте взрослых испытуемых, получено, что с ростом оценок СЭС и ОС семей, в которых воспитывались испытуемые в детстве, возрастает уровень способностей и удельный вес наследственных факторов в возникновении индивидуальных различий у взрослых. Вклад разделенной среды при этом падает либо остается без изменений [34, 35].

В психогенетических работах практически не рассмотрен вопрос о роли СЭС в изменении этиологии структуры взаимосвязей языковых характеристик. Ранее нами было получено, что тесные взаимосвязи между различными языковыми характеристиками, наблюдаемые в младшем школьном возрасте, в существенной степени объясняются общими генетическими влияниями и в меньшей степени — влияниями общесемейной среды [36].

Целью данной работы стала пилотная оценка различий в степени взаимосвязи между языковыми характеристиками путем изучения фенотипических корреляций и оценка различий в генотип-средовых соотношениях по наблюдаемым взаимосвязям в зависимости от ОС матери путем подсчета генотипических и средовых корреляций между характеристиками языкового развития. Для достижения цели пилотного исследования применен близнецовый метод.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки уровня языковых способностей использовали Гейдельбергский тест речевого развития (Гт) [37]. Разделы, названия субтестов и сферы операций, на исследование которых он направлен, представлены в табл. 1. Сырые баллы по субтестам переводились в стандартные баллы в соответствии с руководством к тесту для возрастных групп 7 лет — 7 лет 11 мес., 8 лет — 8 лет 11 мес., что позволило устранить фактор возрастных различий в уровне выполнения Гт.

Условия воспитания близнецов анализировали по данным анкетирования матерей. Была разработана специальная анкета, которая включала в себя 11 вопросов в разделе «Сведения о семье» и 52 вопроса в разделе

Таблица 1. Разделы, субтесты Гейдельбергского теста и соответствующие им сферы языковых операций

Раздел теста	Субтесты	Сферы операций
Структура предложений	Понимание грамматических структур (ГС)	Предложение
	Непосредственное запоминание и повторение грамматических структур (ИС)	
Морфологические структуры	Образование множественного числа существительных (МЧ)	Морфема
	Образование однокоренных слов (СО)	
	Образование степеней сравнения имен прилагательных (СП)	
Значение предложений	Коррекция семантически неверных предложений (КС)	Фраза
	Конструирование предложений (КП)	
Значение слов	Нахождение слов по аналогии (НС)	Слово
	Классификация понятий по общим признакам (КлП)	
Интерактивное значение	Вариация названий (наименование одного и того же лица в зависимости от контекста межличностного общения) (ВН)	Высказывание / речевой акт
	Установление взаимосвязи вербальной и невербальной эмоционально окрашенной информации (ВНИ)	
	Кодирование информации с учетом специфических ролевых признаков (КИ)	
Обобщающая ступень	Запоминание и пересказ текста (рассказа) (ЗР)	Текст

«Сведения о близнецах». В первой части необходимо было указать такие аспекты, как возраст, образование родителей, сколько детей всего в семье, доход, профессиональный статус родителей, наличие других взрослых в семье, как проводят досуг в семье. Во второй части родители отвечали на вопросы, касающиеся близнецов: о первых месяцах жизни детей (вес при рождении, травмы, длительные заболевания в детстве), о раннем моторном и речевом развитии; как складываются у них отношения со сверстниками, взрослыми, родителями. Ряд вопросов касался особенностей внутрипарных отношений близнецов и тенденции к индивидуализации в создании родителями средовых и воспитательных условий для каждого близнеца. Матерей просили, представляя типичные ситуации из жизни семьи, выбрать один из предложенных вариантов ответов на каждый вопрос либо записывать свои варианты ответов, когда вопрос был открытым или выбрать ответ из представленных вариантов оказалось трудно. Результаты анкетирования по каждому вопросу представлялись в виде дихотомических шкал (кроме тех случаев, когда данные могли быть представлены в виде порядковых шкал).

Статистический анализ проводили с помощью пакета SPSS 20.0. Оценки внутрипарных корреляций близнецов и коэффициентов наследуемости для подсчета генетических и средовых корреляций взяты из нашей работы [32]. Оценку различий по уровню признака производили с помощью дисперсионного анализа. Взаимосвязь между дихотомическими признаками изучали с помощью коэффициента ассоциации Пирсона ϕ . Для получения фенотипических корреляций (r) между субтестами Гт вычисляли коэффициенты межклассовых корреляций Пирсона r по двум подгруппам испытуемых, сформированных из выборок монозиготных (МЗ) и дизиготных (ДЗ) близнецов: в каждой подгруппе было по одному близнецу, выбранному в случайном порядке из каждой МЗ и ДЗ пары. Объединение допустимо, поскольку практически по всем субтестам Гт и итоговой оценке между МЗ и ДЗ близнецами не наблюдаются значимых различий (табл. 2). Выборки не отличались по средним оценкам выполнения Гт. Корреляции усредняли путем Z-преобразования. Генетические корреляции (r_g) между субтестами вычисляли по соответствующим формулам по выборкам МЗ и ДЗ близнецов отдельно, полученные оценки усреднялись. Формула для вычисления генетических корреляций:

$$r_{gij} = \frac{1/2 (r_{Fij} + r_{Fji})}{\sqrt{r_{Fii} r_{Fjj}}},$$

где r_{Fij} , r_{Fji} — коэффициенты корреляции между i (признаком одного партнера) и j (признаком второго партнера); r_{Fii} , r_{Fjj} — коэффициенты корреляции между одноименными признаками двух партнеров. Среднюю генетическую корреляцию определяли по формуле

$$r_g = \frac{\frac{r_{g(MZ)} / S^2_{r_{g(MZ)}} + r_{g(DZ)} / S^2_{r_{g(DZ)}}}{1 / S^2_{r_{g(MZ)}} + 1 / S^2_{r_{g(DZ)}}},$$

где r_g — коэффициент генетической корреляции; S_{r_g} — ошибка коэффициента генетической корреляции [38]. Средовые корреляции (r') вычисляли на основании фенотипических и генотипических корреляций, коэффициентов наследуемости субтестов Гт. Формула для подсчета средовых корреляций:

$$r' = \frac{r_g - r\sqrt{hH}}{\sqrt{(1-h)(1-H)}},$$

где r_g — коэффициент генетической корреляции; r — коэффициент фенотипической корреляции; h и H — коэффициенты наследуемости коррелируемых признаков [39]. Для изучения вклада общесемейной и индивидуальной среды во взаимосвязь между субтестами сопоставляли величины интраиндивидуальных и внутрипарных кросс-корреляций между субтестами Гт по выборке МЗ [40].

Совокупная выборка состояла из 68 однополых пар близнецов в возрасте 7 лет — 8 лет 11 мес. ($\bar{x} = 8,00$, $S = 0,65$): 35 — монозиготных и 33 — дизиготных пар, обучающихся в нескольких общеобразовательных школах г. Москвы. Среди близнецов — 36 пар девочек и 32 пары мальчиков. После обращения к руководству школ с просьбой указать, обучаются ли в школах близнецы необходимого для исследования возраста, экспериментатор связывался с родителями и получал их согласие на тестирование языкового развития близнецов и анкетирование матерей по месту жительства семей. На момент исследования всех детей можно отнести к выборке условно здоровых: никаких жалоб от матерей на отклонения в физическом и психическом развитии не поступало. Тестирование проводили с каждым близнецом отдельно в свободное от учебы время. Для разделения выборки близнецов на подгруппы по ОС матерей использовали данные анкетирования матерей. В одной семье близнецов воспитывала только бабушка, пара была исключена из анализа. В подгруппу детей из семей со средним ОС матерей вошли близнецы, чьи матери имеют незаконченное среднее, среднее или среднее специальное образование (17 МЗ и 11 ДЗ пар). В подгруппу детей из семей с высоким ОС матерей вошли близнецы, чьи матери имеют незаконченное или полное высшее образование (17 МЗ и 22 ДЗ пары).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дисперсионный анализ показывает, что по многим субтестам Гт наблюдаются статистически значимые и воспроизводимые для двух групп (в каждой — по одному близнецу из пары) различия между детьми из семей со средним и высоким ОС матерей вне зависимости от зиготности близнецов (табл. 2). Результаты близнецов из семей с высоким ОС матерей выше, чем у близнецов из семей со средним ОС матерей по субтестам «Имитация грамматических структур» ($p < 0,05$ в одной группе), «Словообразование» ($p < 0,001$), «Образование сравнительных степеней прилагательных» ($p < 0,05$ в одной группе), «Коррекция семантически неверных предложений» ($p < 0,05$), «Конструирование предложений» ($p < 0,05$), «Вариация названий» ($p < 0,05$), «Запоминание рассказа» ($p < 0,005$). Различия отражаются в итоговой оценке по тесту ($p < 0,005$).

Сопоставление результатов анкетирования матерей с высоким и средним ОС позволяет говорить о разной степени индивидуализированного отношения к каждому близнецу в паре. Матери с высоким ОС стремятся одевать партнеров по близнецовой паре скорее по-разному, чем одинаково ($\phi = 0,34$; $p < 0,01$); чаще давать индивидуальные поручения каждому близнецу из пары при выполнении работы по дому ($\phi = 0,33$; $p < 0,01$); выполнять работу по дому чаще с каждым близнецом по отдельности, чем с обоими детьми одновременно ($\phi = 0,30$; $p < 0,05$). Такие

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа по двум подвыборкам близнецов (в каждой — по одному близнецу из пары)

ОРД факторов и их взаимодействия	Зиготность		Образовательный статус		Зиготность × образовательный статус	
	F _{эмп}	p	F _{эмп}	p	F _{эмп}	p
ГС ₁	1,991	0,163	2,264	0,137	0,139	0,710
ГС ₂	1,914	0,171	3,555	0,064	1,701	0,197
ИС ₁	0,776	0,382	3,290	0,074	0,036	0,851
ИС ₂	0,436	0,511	4,750	0,033	0,003	0,954
МЧ ₁	0,004	0,949	1,606	0,208	0,456	0,502
МЧ ₂	0,639	0,427	0,329	0,568	0,625	0,432
СО ₁	0,393	0,533	11,811	0,001	3,173	0,080
СО ₂	0,281	0,598	11,521	0,001	0,342	0,561
СП ₁	1,224	0,273	5,153	0,027	0,627	0,431
СП ₂	1,175	0,282	3,519	0,065	0,052	0,821
КС ₁	0,101	0,751	10,886	0,002	0,181	0,672
КС ₂	0,014	0,907	4,105	0,047	1,054	0,309
КП ₁	0,907	0,345	4,707	0,034	0,877	0,353
КП ₂	0,221	0,640	5,291	0,025	0,029	0,865
НС ₁	6,337	0,014	1,721	0,194	2,484	0,120
НС ₂	0,002	0,963	0,000	0,985	0,482	0,490
КлП ₁	0,941	0,336	2,239	0,140	0,787	0,378
КлП ₂	0,016	0,900	3,450	0,068	3,041	0,086
ВН ₁	0,683	0,412	11,634	0,001	0,118	0,733
ВН ₂	0,300	0,586	5,734	0,012	1,927	0,170
ВНИ ₁	0,459	0,501	2,366	0,129	0,687	0,410
ВНИ ₂	2,047	0,157	0,048	0,828	0,655	0,421
КИ ₁	0,064	0,801	0,554	0,460	2,739	0,103
КИ ₂	0,452	0,504	1,297	0,259	1,456	0,232
ЗР ₁	0,150	0,700	14,043	0,000	1,061	0,307
ЗР ₂	0,325	0,571	9,986	0,002	0,427	0,516
Итоговая оценка ₁	1,456	0,232	10,074	0,002	0,021	0,884
Итоговая оценка ₂	0,986	0,324	11,010	0,002	0,748	0,390

Примечание. Нижний индекс 1 — выборка, состоящая из первых партнеров по близнецовым парам; нижний индекс 2 — выборка, состоящая из вторых партнеров по близнецовым парам; ОРД — основной результат действия; F_{эмп} — эмпирическое значение F-критерия; p — точный уровень статистической значимости.

матери чаще отмечают, что близнецы склоны выполнять поручения по дому чаще раздельно, чем вместе ($\varphi = 0,25$; $p < 0,05$).

Подсчитаны фенотипические корреляции между субтестами Гт по двум выборкам, в каждую включены по одному близнецу из МЗ и ДЗ пар, чьи матери имеют высокий ОС ($n_1 = 39$, $n_2 = 39$). Воспроизводятся, как правило, высокие и значимые взаимосвязи между большинством субтестов, относящихся к сферам грамматики, морфологии, значений предложений и работы с целостным текстом. Предположительно, эти субтесты составляют относительно единый фактор, названный нами «Языковая компетенция». Воспроизводятся незначимые и низкие корреляции субтестов «Классификация понятий», «Взаимосвязь вербальной и невербальной информации» и «Кодирование информации». Статистически значимых различий между корреляциями не обнаружено; пары корреляций усреднены посредством Z-преобразования. Результаты представлены в табл. 3. Корреляции варьируют от $r_{ВН \times КИ} = -0,076$ до $r_{ГС \times СП} = 0,711$. Средневзвешенный коэффициент корреляции равен $r = 0,398$. В среднем 15,84 % индивидуальных различий по каким-либо парам субтестов Гт в выборке близнецов, воспитывающихся матерями с высо-

ким ОС, объясняются взаимной изменчивостью оценок по этим субтестам. При исключении из обобщенного анализа коэффициентов корреляций субтестов «Классификация понятий», «Взаимосвязь вербальной и невербальной информации» и «Кодирование информации» между собой и с другими субтестами выявлено, что средневзвешенный коэффициент корреляции варьирует в пределах от $r_{МЧ \times ВН} = 0,096$ до $r_{ГС \times СП} = 0,711$. Т. е. 77,14 % незначимых корреляций приходится на исключенные из фактора «Языковая компетенция» субтесты. Средневзвешенный коэффициент фенотипической корреляции равен $r = 0,548$.

Генотипические корреляции подсчитаны практически во всех случаях, за исключением корреляций субтестов «Вариация названий», «Взаимосвязь вербальной и невербальной информации» и «Кодирование информации» друг с другом и другими субтестами. Корреляции варьируют в диапазоне от $r_{ГС \times КлП} = 0,137$ до $r_{ГИС \times КС} = 0,986$. На основании подсчета средневзвешенной корреляции ($r_g = 0,693$) и коэффициента детерминации можно утверждать, что в среднем 48,02 % индивидуальных различий по рассматриваемым парам языковых характеристик объясняются воздействием каких-то общих для этих пар генетических факторов. Если исключить из анализа генетические кор-

Таблица 3. Усредненные фенотипические, генотипические и средовые корреляции по субтестам Гейдельбергского теста по выборкам близнецов из семей с высоким и средним образовательным статусом матерей

Суб-тесты	ГС	ИС	МЧ	СО	СП	КС	КП	НС	КлП	ВН	ВНИ	КИ	ЗР
ГС		0,549****	0,283	0,509****	0,711****	0,571****	0,544****	0,468***	0,311	0,421**	0,328*	0,167	0,663****
		0,896	0,374	0,428	0,757	0,829	0,760	0,911	0,137	–	–	–	0,800
		0,232	0,225	0,818	0,755	0,655	0,453	–	0,396	–	–	–	0,670
ИС	0,487**		0,432**	0,333*	0,585****	0,515****	0,573****	0,456***	0,291	0,222	0,113	0,248	0,555****
	0,542		0,616	0,596	0,702	0,986	0,928	0,905	0,976	–	–	–	0,763
	0,601		–0,048	–0,953	0,250	–	0,380	–	–0,672	–	–	–	–0,314
МЧ	0,323	0,294		0,207	0,387*	0,345*	0,460****	0,501****	0,181	0,096	0,083	0,093	0,353*
	0,718	0,695		0,380	0,433	0,248	0,483	0,604	0,556	–	–	–	0,293
	–	–		–0,236	0,305	0,534	0,496	–	–0,132	–	–	–	0,509
СО	0,140	0,170	0,342		0,527****	0,594****	0,348*	0,370*	0,364*	0,473***	0,255	0,237	0,413**
	–	–	–		0,925	0,714	0,664	0,849	0,209	–	–	–	0,549
	–	–	–		–0,646	–	0,096	–	0,729	–	–	–	–0,109
СП	0,369	0,410*	0,427*	0,225		0,557****	0,544****	0,489***	0,309	0,471***	0,288	0,219	0,545****
	0,214	0,347	0,717	–		0,735	0,865	0,909	0,513	–	–	–	0,577
	0,479	0,448	–	–		0,894	0,356	–	0,148	–	–	–	0,473
КС	0,501**	0,511**	0,295	0,208	0,087		0,533****	0,538****	0,338*	0,290	0,109	0,192	0,558****
	0,881	0,716	0,576	–	0,002		0,907	0,855	0,284	–	–	–	0,620
	–	–	–	–	–		0,583	–	0,397	–	–	–	–
КП	0,396*	0,355	0,508**	0,107	0,346	0,556****		0,358*	0,141	0,245	0,204	0,167	0,395*
	0,655	0,715	0,767	–	0,432	0,511		0,932	0,944	–	–	–	0,365
	–	–	–	–	–	–		–	–0,198	–	–	–	0,557
НС	0,326	0,431*	0,209	0,120	0,243	0,120	0,275		0,425**	0,232	0,221	0,273	0,513****
	0,496	0,402	0,783	–	0,352	0,476	0,974		0,391	–	–	–	0,727
	0,198	0,464	–	–	0,172	–	–		–	–	–	–	–
КлП	–0,072	–0,072	–0,170	0,330	–0,291	–0,040	–0,238	–0,032		0,170	–0,003	0,191	0,236
	–0,164	–0,274	–0,550	–	–0,283	–0,165	–0,679	0,021		–	–	–	0,414
	–0,035	–0,027	–	–	–0,303	–	–	–0,055		–	–	–	0,074
ВН	0,516***	0,373*	0,533***	0,289	0,386*	0,517***	0,477**	0,191	–0,058		0,127	–0,076	0,292
	0,682	0,710	0,646	–	0,560	0,611	0,478	0,814	–0,136		–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–	–
ВНИ	–0,044	–0,077	–0,122	–0,143	0,096	0,015	0,109	0,034	–0,273	–0,040		0,139	0,317*
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–		–	–
КИ	0,346	0,436*	0,400*	0,222	0,348	0,209	0,396*	0,413*	–0,063	0,365	0,466*		0,156
	0,359	0,715	0,782	–	0,435	0,605	0,689	0,450	0,212	0,657	–		–
	0,359	0,373	–	–	0,324	–	–	0,414	–0,130	–	–		–
ЗР	0,574***	0,240	0,426*	0,211	0,092	0,571****	0,290	0,171	0,002	0,241	–0,122	0,164	
	0,932	0,396	0,604	–	0,297	0,581	0,648	0,226	–0,055	0,811	–	0,509	
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	

Примечание. В верхней части таблицы представлены данные по выборке близнецов из семей с высоким образовательным статусом матерей; в нижней части — данные по выборке близнецов из семей со средним образовательным статусом матерей; в каждой ячейке в первых строках даны величины фенотипических корреляций, во вторых строках — величины генотипических корреляций и в третьих строках — величины средовых корреляций; прочерк — корреляции вычислить невозможно.

Здесь и далее уровни статистической значимости: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,005$; **** — $p < 0,001$.

реляции субтестов Гт с субтестом «Классификация понятий», то окажется, что самой низкой корреляцией является $r_{g_{МЧ} \times КС} = 0,248$, средневзвешенная корреляция изменится незначительно $r_g = 0,714$, что дает в среднем 50,98 % объясненной дисперсии оценок каких-либо пар характеристик языковой компетенции общими генетическими факторами.

Получены 33 средовые корреляции, которые варьируют в диапазоне от $r'_{ИС \times СО} = -0,953$ до $r'_{СП \times КС} = 0,894$. При таком разбросе величин корреляций средневзвешенная корреляция оказалась $r' = 0,234$, а процент дисперсии индивидуальных различий по каким-либо парам характеристик, который объясняет взаимную вариативность оценок этих пар, в среднем составляет 5,48 %. Если исключить из

анализа данные по субтесту «Классификация понятий», то величина средневзвешенной корреляции становится чуть выше $r' = 0,277$ (коэффициент детерминации $r'^2 = 0,077$).

Чтобы получить представление о соотношении фенотипических, генотипических и средовых корреляций между сферами языковой компетенции в выборке близнецов, воспитывающихся матерями с высоким ОС, проанализируем средневзвешенные показатели, высчитанные по случаям, когда вычислены три типа корреляций. Средневзвешенные коэффициенты фенотипической и генотипической корреляции равны $r = 0,468$ и $r_g = 0,626$ соответственно, коэффициенты детерминации — $r^2 = 0,219$ и $r_g^2 = 0,392$ соответственно.

Хотя процент средовых влияний, вносящих вклад в возникновение фенотипических взаимосвязей между различными языковыми характеристиками, мал, остается открытым вопрос о природе этих средовых влияний. Это могут быть общесемейные факторы, которые приводят, помимо общего генетического фактора, к возникновению наблюдаемых взаимосвязей между языковыми характеристиками. Однако возможны и индивидуальные влияния на каждую языковую способность, которые в конечном счете могут вести к актуализации общего для различных характеристик генетического фактора, что может также приводить к фенотипическим корреляциям между субтестами Гт.

Предварительный ответ на вопрос, объясняется ли обнаруженный вклад средовых факторов в структуру взаимосвязей между субтестами преимущественно общесемейными средовыми влияниями либо влияниями факто-

ров индивидуальной среды, позволяет дать следующий способ анализа [40]. Предлагается сопоставить внутрииндивидуальные и внутрипарные кросс-корреляции между различными субтестами только в выборке МЗ близнецов. В первом случае эти корреляции объясняются общими генами, общей средой и общностью индивидуальных средовых влияний. Во втором случае корреляции могут объясняться только общими для двух близнецов генами и общей средой, поскольку индивидуальные средовые влияния для каждого близнеца будут различаться. Если внутрииндивидуальные кросс-корреляции будут существенно выше внутрипарных корреляций, это будет означать, что фенотипические корреляции между разными субтестами объясняются индивидуальными средовыми влияниями. Если же различий не будет, тогда фенотипические корреляции объясняются воздействием одних и тех же факторов общесемейной среды.

Усредненные по двум выборкам МЗ близнецов (в каждую выборку вошло по одному партнеру из близнецовой пары) внутрииндивидуальные и внутрипарные кросс-корреляции представлены в табл. 4. Значительных отличий между указанными типами корреляций не наблюдается.

Величины фенотипических корреляций между субтестами Гт, высчитанные по выборке близнецов из семей, в которых матери имеют средний ОС, оказались ниже, чем в выборке близнецов, которых воспитывают матери с высоким ОС. В двух подвыборках, в каждую из которых вошло по одному партнеру из МЗ и ДЗ пары ($n_1 = 28$, $n_2 = 28$), высока доля незначимых корреляций. Во многих случаях

Таблица 4. Усредненные внутрииндивидуальные и внутрипарные кросс-корреляции МЗ близнецов из семей с высоким образовательным уровнем матерей

Субтесты	ИС	МЧ	СО	СП	КС	КП	НС	КлП	ВН	ВНИ	КИ	ЗР
ГС	0,714***	0,214	0,652***	0,700***	0,663***	0,634**	0,423	0,136	0,408	0,425	0,266	0,697***
	0,755****	0,203	0,542*	0,532*	0,663***	0,650***	0,618**	0,147	0,387	0,294	0,156	0,727****
ИС		0,405	0,505*	0,697***	0,699***	0,668***	0,573*	0,238	0,250	0,398	0,375	0,714***
		0,455	0,537*	0,636**	0,754****	0,731****	0,660***	0,329	0,313	0,083	0,266	0,725****
МЧ			0,099	0,324	0,429	0,500*	0,546*	0,004	-0,167	0,086	0,221	0,403
			0,157	0,366	0,366	0,486*	0,366	0,136	-0,053	0,060	0,254	0,371
СО				0,715****	0,568*	0,575*	0,368	0,323	0,489*	0,443	0,200	0,421
				0,694***	0,617**	0,618**	0,609**	0,272	0,431	0,595*	0,129	0,463
СП					0,656***	0,780****	0,455	0,164	0,398	0,370	0,327	0,424
					0,641***	0,746****	0,666***	0,326	0,369	0,313	0,238	0,544*
КС						0,627**	0,616**	0,338	0,143	0,268	0,207	0,669***
						0,747****	0,576*	0,159	0,224	0,472	0,489*	0,597*
КП							0,447	0,016	0,369	0,366	0,282	0,505
							0,612**	0,345	0,130	0,281	0,355	0,551*
НС								0,303	0,126	0,225	0,247	0,616**
								0,111	0,276	0,397	0,301	0,503*
КлП									0,161	-0,023	0,076	0,288
									0,242	0,341	0,106	0,134
ВН										0,204	-0,313	0,220
										0,273	-0,103	0,294
ВНИ											0,220	0,371
											-0,002	0,168
КИ												0,203
												0,233

Примечание. В каждой ячейке вверху — усредненные внутрииндивидуальные кросс-корреляции МЗ близнецов, внизу — усредненные внутрипарные кросс-корреляции МЗ близнецов.

статистически значимые корреляции в одной подвыборке не воспроизводятся в другой. Однако значимых различий между корреляциями не обнаружено, они могут быть усреднены посредством Z-преобразования. Результаты приведены в табл. 3.

Корреляции варьируют в пределах от $r_{СП \times КЛП} = -0,291$ до $r_{ГС \times ЗР} = 0,574$. Средневзвешенный показатель по всем корреляциям составляет $r = 0,313$. Таким образом, индивидуальные различия по рассматриваемым парам субтестов в среднем на 9,80 % объясняются взаимной вариативностью их оценок. Если исключить из анализа субтесты «Классификация понятий», «Взаимосвязь вербальной и невербальной информации» и «Кодирование информации», на которые приходится 47,37 % всех статистически незначимых коэффициентов корреляции, то самой низкой корреляцией станет $r_{СП \times КС} = 0,087$. Судя по средневзвешенной фенотипической корреляции $r = 0,356$, дисперсии оценок по субтестам в среднем на 12,67 % объясняются их взаимной вариацией.

Удалось подсчитать 70,51 % генетических корреляций от возможного количества случаев; корреляции варьируют в широком диапазоне от $r_{ГКЛ \times КЛП} = -0,679$ до $r_{ГКЛ \times НС} = 0,974$. Если включить в анализ только случаи взаимосвязи характеристик языковой компетенции друг с другом, то самой низкой генетической корреляцией станет $r_{СП \times КС} = 0,002$. Средневзвешенный коэффициент генетической корреляции составит $r_g = 0,625$, в среднем взаимная вариация каких-либо пар различных характеристик языковой компетенции на 39,06 % объясняется воздействием общих для рассматриваемых пар субтестов генетических факторов.

Для того, чтобы провести сравнительный анализ групп близнецов, воспитывающихся материями с высоким и средним ОС, выделены 28 случаев взаимосвязей между характеристиками фактора «Языковая компетенция», для которых подсчитаны фенотипические и генотипические корреляции в обеих выборках. В группе близнецов из семей с высоким ОС средневзвешенная фенотипическая корреляция составляет $r = 0,499$, а генотипическая — $r_g = 0,706$, а коэффициенты детерминации — $r^2 = 0,249$ и $r_g^2 = 0,498$ соответственно. В группе близнецов, воспитывающихся материями со средним ОС, средневзвешенные фенотипическая ($r = 0,351$) и генотипическая ($r_g = 0,559$) корреляции оказались ниже (коэффициенты детерминации — $r^2 = 0,123$ и $r_g^2 = 0,312$ соответственно).

Удалось подсчитать средовые корреляции только в 19,23 % всех возможных случаев, большая часть которых приходится на, как правило, отрицательные и низкие корреляции субтестов «Классификация понятий» и «Кодирование информации» между собой и другими субтестами Гт. К сожалению, невозможно выделить достаточное количество случаев средовых корреляций ни для обобщенного анализа, ни для сопоставления средовых корреляций по одним и тем же случаям, полученным в выборках близнецов, воспитывающихся материями с высоким и средним ОС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Дети из семей с высоким ОС матерей, имеют оценки выше по большинству языковых субтестов, чем близнецы, матери которых имеют средний ОС. Различия не зависят от зиготности близнецов, что является основанием для объединения выборок МЗ и ДЗ близнецов для изучения структуры

фенотипических корреляций. Различия по двум выборкам, в каждую из которых было включено по одному близнецу из пары, воспроизводятся по 7 субтестам, относящимся к сферам грамматики, морфологии, значений предложений и слов и оперирования целостным текстом. Результат согласуется с данными зарубежных [8, 10] и отечественных [11] исследований.

Обнаружены корреляции ОС с анкетными данными, указывающими на особенности воспитания близнецов. Результаты в целом подтверждают данные исследований, в которых высокий ОС родителей связан со стремлением создать для детей обогащенную развивающую среду [5, 12–14]. Данная работа указывает на то, что подобная тенденция свойственна и для семей, воспитывающих детей младшего школьного возраста. Результаты позволяют утверждать, что ОС матери указывает на степень субъективной активности матерей в вопросах индивидуализации воспитания детей. В случае воспитания детей-близнецов мать с высоким ОС стремится создавать развивающую среду, которая позволила бы преодолеть излишне тесную связь близнецов в паре и помогла бы каждому ребенку стать индивидуальностью. Проблема индивидуализации в развитии — одна из важнейших проблем личностного развития близнецов [19].

Обнаружено, что структура взаимосвязей между субтестами Гт изменяется у детей в зависимости от того, в семьях с каким ОС матерей они воспитываются. В подгруппе близнецов из семей, в которых матери имеют высокий ОС, относительно тесные фенотипические корреляции обнаружены между 10 субтестами, относящимися в основном к сферам грамматики, морфологии, значений предложений и оперирования целостным текстом. Содержание этих субтестов соотносится именно со способностями к оперированию языковыми конструкциями, а не с характеристиками, связанными с мышлением либо использованием языковых средств в прагматических целях коммуникации. На основании воспроизводимых в обеих группах близнецов (в каждой — по одному близнецу из пары) корреляций выделен общий языковой фактор, получивший название «Языковая компетенция». В среднем 30,03 % индивидуальных различий по характеристикам, входящим в фактор языковой компетенции, объясняется взаимной вариативностью этих характеристик. В подгруппе близнецов, матери которых имеют средний ОС, корреляции между субтестами значительно ниже; существенный процент незначимых корреляций приходится на связь субтестов, исключенных из фактора языковой компетенции, друг с другом и другими субтестами. В среднем только 12,67 % индивидуальных различий по характеристикам, входящим в фактор языковой компетенции, объясняются взаимной вариацией этих характеристик. Данные оценки являются приблизительными, полученными на основании обобщенного анализа корреляционных матриц и подсчетом средневзвешенных корреляций. При увеличении числа испытуемых возможно применение других более совершенных методов статистического анализа. Таким образом, повышению уровня языковых способностей у детей из семей с высоким ОС матерей сопутствует увеличение структурной связанности этих языковых характеристик.

Результаты позволяют получить предварительный ответ на вопрос, изменяется ли природа фенотипических связей между языковыми характеристиками у детей в зависимости от ОС их матерей. Поскольку не по всем парам субтестов удалось подсчитать генотипические корреляции, сравнительный анализ структур генетических

корреляций подгрупп близнецов с разным ОС их матерей можно сделать лишь по 28 случаям. Если в выборке близнецов из семей с высоким ОС матерей фенотипические дисперсии рассматриваемых сфер языковой компетенции в среднем примерно на 24,90 % объясняются взаимной вариацией этих характеристик, то в выборке детей из семей со средним ОС матерей взаимная фенотипическая вариативность одноименных субтестов описывает около 12,32 % полученных оценок. При этом, если в первой выборке наблюдаемые взаимосвязи в среднем примерно на 49,84 % объясняются воздействием общих генетических факторов, то во второй выборке вклад общих генетических факторов в объяснение полученных фенотипических корреляций достигает только 31,25 %. Есть основания полагать, что фактор образования матери обуславливает различия не только в генотип-средовых соотношениях по языковым характеристикам, что зафиксировано в исследованиях, проведенных за рубежом [33] и в нашей стране [32]. Он детерминирует различия в уровне обусловленности структурной взаимосвязанности характеристик языковой компетенции со стороны каких-то общих для них генетических факторов. Следуя предположениям биоэкологической модели Бронфенбреннера и Сеси и представлениям Скарр [21, 22], можно предположить, что индивидуализированное воспитание детей матерями с высоким ОС посредством создания стимулирующей языковое развитие среды приводит к актуализации генетического потенциала, лежащего в основе общего языкового фактора. Психогенетический подход, основанный на представлениях биометрической статистики, не позволяет выявить эти гены. Наше исследование является дополнительным основанием для поиска этих генов посредством молекулярно-генетических методов.

Результаты позволяют произвести сравнительный анализ вклада генетических и средовых факторов в структуру взаимосвязей языковых характеристик только в подгруппе близнецов, чьи матери имеют высокий ОС. В среднем по 33 случаям, для которых подсчитаны фенотипические, генотипические и средовые корреляции, пятая часть (21,90 %) индивидуальных различий по коррелируемым субтестам объясняется их взаимной вариацией, при этом в среднем 39,19 % их взаимной вариативности объясняются воздействием какого-то общего для рассматриваемых пар субтестов генетического фактора и только порядка 7,67 % — средовыми влияниями.

Сопоставление внутрииндивидуальных и внутрипарных кросс-корреляций между различными субтестами в выборке МЗ близнецов позволило сделать предварительное заключение о том, что незначительная величина средовой составляющей фенотипических корреляций между субтестами Гт объясняется воздействиями общесемейной среды. В связи с этим и в свете выявленной тенденции к индивидуализации развивающейся среды в семьях с высоким ОС матерей необходимо объяснить полученные по некоторым случаям отрицательные средовые корреляции.

Например, самая высокая отрицательная средовая корреляция $r' = -0,953$ наблюдается между субтестами «Словообразование» и «Имитация грамматических структур». При умеренной положительной фенотипической взаимосвязи ($r = 0,333$) и существенной положительной генетической корреляции ($r_g = 0,596$) средовые влияния приводят к прямо противоположным результатам в развитии обеих способностей. Слабые отличия интраиндивидуальной от внутрипарной кросс-корреляции между этими субтестами указывают на то, что мы имеем дело с общесредовыми влияниями, которые приводят к диаметрально противоположным результатам в фенотипических показателях этих способностей. При этом сохраняется умеренная фенотипическая взаимосвязь между оценками по двум рассматриваемым субтестам.

Можно утверждать следующее: индивидуализация воспитательных воздействий в семьях с высоким ОС матерей приводит к увеличению уровня языкового развития детей, росту структурной связанности характеристик языковой компетенции, увеличению удельного веса общего генетического фактора и снижению роли общесемейной среды в объяснении природы этой структурной связанности.

ВЫВОДЫ

Высокий образовательный статус матери является фактором повышения уровня языковой компетенции ребенка за счет создания более индивидуализированной развивающей среды (в контексте нашего близнецового исследования: для каждого партнера по близнецовой паре вне зависимости от зиготности). С повышением образовательного статуса матерей у детей наблюдается рост структурной целостности сфер языковой компетенции, что в существенной степени обеспечивается увеличением вклада общих для языковых характеристик генетических факторов. При этом общие, преимущественно общесемейные, средовые факторы вносят существенно меньший вклад в обеспечение взаимосвязанности сфер языковой компетенции ребенка.

Цель пилотного исследования достигнута. Сделанные выводы носят предварительный характер. Необходимы исследования на больших по объему выборках, которые должны быть составлены на основании более точных критериев, учитывающих все параметры социоэкономического статуса семьи. С целью преодоления ограничений, свойственных близнецовому методу, необходимо проведение исследований с использованием других психогенетических методов. Это позволит провести обобщенный анализ с использованием данных, полученных от разных типов пар родственников, и применить более сложные генетико-математические методы. Выполнение этих видов работ позволит подойти к проведению молекулярно-генетических исследований этиологии индивидуальных различий по языковым характеристикам.

Литература

- Bradley RH, Corwyn RF. Socioeconomic status and child development. *Annu Rev Psychol.* 2002; 53: 371–99. PubMed PMID: 11752490.
- Чернов Д. Н. Социокультурная обусловленность становления языковой компетенции. М.: ТЕЗАУРУС; 2014. 151 с.
- Arriaga RI, Fenson L, Cronan T, Pethick SJ. Scores on the MacArthur Communicative Development Inventory of children from low- and middle-income families. *Appl Psycholinguist.* 1998; 19 (2): 209–23.
- Dollaghan CA, Campbell TF, Paradise JL, Feldman HM, Janosky JE, Pitcairn DN, et al. Maternal education and measures of early speech and language. *J Speech Lang Hear Res.* 1999

- Dec; 42 (6): 1432–43. PubMed PMID: 10599625.
5. Hoff-Ginsberg E. The relation of birth order and socioeconomic status to children's language experience and language development. *Appl Psycholinguist*. 1998; 19 (4): 603–29.
 6. Huttenlocher J, Waterfall H, Vasilyeva M, Vevea J, Hedges LV. Sources of variability in children's language growth. *Cogn Psychol*. 2010 Dec; 61 (4): 343–65. PubMed PMID: 20832781.
 7. Morisset C, Barnard K, Greenberg M, Booth C, Spieker S. Environmental influences on early language development: The context of social risk. *Dev Psychopathol*. 1990; 2 (2): 127–49.
 8. Jordan N, Huttenlocher J, Levine S. Differential calculation abilities in young children from middle- and low-income families. *Dev Psychol*. 1992; 28 (4): 644–53.
 9. Lawrence VW. Middle- and working-class Black and White children's speech during a picture-labeling task. *J Genet Psychol*. 1997 Jun; 158 (2): 226–40. PubMed PMID: 9168591.
 10. Snow C. Literacy and language: Relationships during the preschool years. *Harv Educ Rev*. 1983 Summer; 53 (2): 165–89.
 11. Чернов Д. Н. Взаимосвязь типа родительского отношения и речевого развития младших школьников в семьях с разным социоэкономическим статусом. Психологические исследования: электрон. науч. журн. [Интернет]. 2011 [дата обращения: 26 июня 2017 г.]; (1): статья № 2 [примерно 7 с.]. Доступно по: <http://psystudy.ru/index.php/num/2011n1-15/430-chernov15.html>
 12. Camp BW, Cunningham M, Berman S. Relationship between the cognitive environment and vocabulary development during the second year of life. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2010 Oct; 164 (10): 950–6. PubMed PMID: 20921353.
 13. Hoff E. The specificity of environmental influence: socioeconomic status affects early vocabulary development via maternal speech. *Child Dev*. 2003 Sep–Oct; 74 (5): 1368–78. PubMed PMID: 14552403.
 14. Hoff-Ginsberg E. Mother-child conversation in different social classes and communicative settings. *Child Dev*. 1991 Aug; 62 (4): 782–96. PubMed PMID: 1935343.
 15. Schady N. Parents' education, mothers' vocabulary, and cognitive development in early childhood: longitudinal evidence from Ecuador. *Am J Public Health*. 2011 Dec; 101 (12): 2299–307. PubMed PMID: 22021308.
 16. Son SH, Morrison FJ. The nature and impact of changes in home learning environment on development of language and academic skills in preschool children. *Dev Psychol*. 2010 Sep; 46 (5): 1103–18. PubMed PMID: 20822226.
 17. Pancsofar N, Vernon-Feagans L; The Family Life Project Investigators. Fathers' early contributions to children's language development in families from low-income rural communities. *Early Child Res Q*. 2010 Oct; 25 (4): 450–63. PubMed PMID: 21057648.
 18. Tamis-LeMonda CS, Shannon JD, Cabrera NJ, Lamb ME. Fathers and mothers at play with their 2- and 3-year-olds: contributions to language and cognitive development. *Child Dev*. 2004 Nov–Dec; 75 (6): 1806–20. PubMed PMID: 15566381.
 19. Равич-Щербо И. В., Марютина Т. М., Григоренко Е. Л. Психогенетика. М.: Аспект Пресс; 1999. 447 с.
 20. Чернов Д. Н. Психогенетические исследования речевых и языковых способностей: краткий обзор и перспективы изучения. Современная зарубежная психология [Интернет]. 2014 [дата обращения: 26 июня 2017 г.]; 3 (2): [5–17]. Доступно по: <http://psyjournals.ru/jmfp/2014/n2/70094.shtml>
 21. Bronfenbrenner U, Ceci SJ. Nature-nurture reconceptualized in developmental perspective: A bio-ecological model. *Psychol Rev*. 1994 Oct; 101 (4): 568–86. PubMed PMID: 7984707.
 22. Scarr S. Developmental theories for the 1990s: development and individual differences. *Child Dev*. 1992 Feb; 63 (1): 1–19. PubMed PMID: 1343618.
 23. Rhemtulla M, Tucker-Drob EM. Gene-by-socioeconomic status interaction on school readiness. *Behav Genet*. 2012 Jul; 42 (4): 549–58. PubMed PMID: 22350185.
 24. Tucker-Drob EM, Rhemtulla M, Harden KP, Turkheimer E, Fask D. Emergence of a gene × socioeconomic status interaction on infant mental ability between 10 months and 2 years. *Psychol Sci*. 2011 Jan; 22 (1): 125–33. PubMed PMID: 21169524.
 25. Turkheimer E, Haley A, Waldron M, D'Onofrio B, Gottesman II. Socioeconomic status modifies heritability of IQ in young children. *Psychol Sci*. 2003 Nov; 14 (6): 623–8. PubMed PMID: 14629696.
 26. Schwartz JA. Socioeconomic status as a moderator of the genetic and shared environmental influence on verbal IQ: A multilevel behavioral genetic approach. *Intelligence*. 2015 Sep–Oct; 52: 80–9.
 27. Hart SA, Petrill SA, Deckard KD, Thompson LA. SES and CHAOS as environmental mediators of cognitive ability: A longitudinal genetic analysis. *Intelligence*. 2007 May–Jun; 35 (3): 233–42.
 28. Tucker-Drob EM, Bates TC. Large cross-national differences in gene × socioeconomic status interaction on intelligence. *Psychol Sci*. 2016 Feb; 27 (2): 138–49. PubMed PMID: 26671911.
 29. Petrill SA, Pike A, Price T, Plomin R. Chaos in the home and socioeconomic status are associated with cognitive development in early childhood: Environmental mediators identified in a genetic design. *Intelligence*. 2004 Sep–Oct; 32 (5): 445–60.
 30. Stromswold K. Biological and psychosocial factors affect linguistic and cognitive development differently: A twin study. In: Bamman D, Magnitskaia T, Zaller C, editors. *BUCLD 30: Proceedings of the 30th annual Boston University Conference on Language Development*; 2005 Nov 4–6; Boston, USA. Somerville, MA: Cascadilla Press; 2006. p. 595–606.
 31. Hart SA, Soden B, Johnson W, Schatschneider C, Taylor J. Expanding the environment: gene × school-level SES interaction on reading comprehension. *J Child Psychol Psychiatry*. 2013 Oct; 54 (10): 1047–55. PubMed PMID: 23725549.
 32. Равич-Щербо И. В., Чернов Д. Н. Психогенетическое исследование индивидуальных особенностей речи в младшем школьном возрасте. Журн. приклад. психол. 2005; (1): 21–9.
 33. Rowe DC, Jacobson KC, Van den Oord EJ. Genetic and environmental influences on vocabulary IQ: Parental education level as moderator. *Child Dev*. 1999 Sep–Oct; 70 (5): 1151–62. PubMed PMID: 10546338.
 34. Bates TC, Lewis GJ, Weiss A. Childhood socioeconomic status amplifies genetic effects on adult intelligence. *Psychol Sci*. 2013 Oct; 24 (10): 2111–6. PubMed PMID: 24002887.
 35. Kremen WS, Jacobson KC, Xian H, Eisen SA, Waterman B, Toomey R, et al. Heritability of word recognition in middle-aged men varies as a function of parental education. *Behav Genet*. 2005 Jul; 35 (4): 417–33. PubMed PMID: 15971023.
 36. Чернов Д. Н. Психогенетическое исследование структуры языковой компетенции. Психологические исследования: электрон. науч. журн. [Интернет]. 2017 [дата обращения: 26 июня 2017 г.]; 10 (52): статья № 10 [примерно 7 с.]. Доступно по: <http://psystudy.ru/index.php/num/2017v10n52/1409-chernov52.html>
 37. Михайлова Н. Б. Адаптированный вариант Гейдельбергского теста речевого развития детей. Психол. журн. 1990; 11 (6): 105–12.
 38. Марютина Т. М. Промежуточные фенотипы интеллекта в контексте генетической психофизиологии. Психология. Журн. Высшей школы экономики. 2007; 4 (2): 22–47.
 39. Searle SR. Phenotypic, genetic and environmental correlation. *Biometrics*. 1961 Sep; 17 (3): 474–80.
 40. Scourfield J, Martin N, Eley TC, McGuffin P. The genetic relationship between social cognition and conduct problems. *Behav Genet*. 2004 Jul; 34 (4): 377–83. PubMed PMID: 15082935.

References

1. Bradley RH, Corwyn RF. Socioeconomic status and child development. *Annu Rev Psychol*. 2002; 53: 371–99. PubMed PMID: 11752490.
2. Chernov DN. *Sotsiokul'turnaya obuslovlennost' stanovleniya yazykovoy kompetentsii*. Moscow: TEZURUS; 2014. 151 p. Russian.

3. Arriaga RI, Fenson L, Cronan T, Pethick SJ. Scores on the MacArthur Communicative Development Inventory of children from low- and middle-income families. *Appl Psycholinguist*. 1998; 19 (2): 209–23.
4. Dollaghan CA, Campbell TF, Paradise JL, Feldman HM, Janosky JE, Pitcairn DN, et al. Maternal education and measures of early speech and language. *J Speech Lang Hear Res*. 1999 Dec; 42 (6): 1432–43. PubMed PMID: 10599625.
5. Hoff-Ginsberg E. The relation of birth order and socioeconomic status to children's language experience and language development. *Appl Psycholinguist*. 1998; 19 (4): 603–29.
6. Huttenlocher J, Waterfall H, Vasilyeva M, Vevea J, Hedges LV. Sources of variability in children's language growth. *Cogn Psychol*. 2010 Dec; 61 (4): 343–65. PubMed PMID: 20832781.
7. Morisset C, Barnard K, Greenberg M, Booth C, Spieker S. Environmental influences on early language development: The context of social risk. *Dev Psychopathol*. 1990; 2 (2): 127–49.
8. Jordan N, Huttenlocher J, Levine S. Differential calculation abilities in young children from middle- and low-income families. *Dev Psychol*. 1992; 28 (4): 644–53.
9. Lawrence VW. Middle- and working-class Black and White children's speech during a picture-labeling task. *J Genet Psychol*. 1997 Jun; 158 (2): 226–40. PubMed PMID: 9168591.
10. Snow C. Literacy and language: Relationships during the preschool years. *Harv Educ Rev*. 1983 Summer; 53 (2): 165–89.
11. Chernov DN. [Interrelation between parent relation type and speech development in primary schoolers from families with different socioeconomic status]. *Psikhologicheskie Issledovaniya* [serial on the Internet]. 2011 [cited 2017 Jun 26]; (1): article 2 [about 7 p.]. Available from: <http://psystudy.ru/index.php/num/2011n1-15/430-chernov15.html> Russian.
12. Camp BW, Cunningham M, Berman S. Relationship between the cognitive environment and vocabulary development during the second year of life. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2010 Oct; 164 (10): 950–6. PubMed PMID: 20921353.
13. Hoff E. The specificity of environmental influence: socioeconomic status affects early vocabulary development via maternal speech. *Child Dev*. 2003 Sep–Oct; 74 (5): 1368–78. PubMed PMID: 14552403.
14. Hoff-Ginsberg E. Mother-child conversation in different social classes and communicative settings. *Child Dev*. 1991 Aug; 62 (4): 782–96. PubMed PMID: 1935343.
15. Schady N. Parents' education, mothers' vocabulary, and cognitive development in early childhood: longitudinal evidence from Ecuador. *Am J Public Health*. 2011 Dec; 101 (12): 2299–307. PubMed PMID: 22021308.
16. Son SH, Morrison FJ. The nature and impact of changes in home learning environment on development of language and academic skills in preschool children. *Dev Psychol*. 2010 Sep; 46 (5): 1103–18. PubMed PMID: 20822226.
17. Pancsofar N, Vernon-Feagans L; The Family Life Project Investigators. Fathers' early contributions to children's language development in families from low-income rural communities. *Early Child Res Q*. 2010 Oct; 25 (4): 450–63. PubMed PMID: 21057648.
18. Tamis-LeMonda CS, Shannon JD, Cabrera NJ, Lamb ME. Fathers and mothers at play with their 2- and 3-year-olds: contributions to language and cognitive development. *Child Dev*. 2004 Nov–Dec; 75 (6): 1806–20. PubMed PMID: 15566381.
19. Ravich-Shcherbo IV, Maryutina TM, Grigorenko EL. *Psikhogenetika*. Moscow: Aspekt Press; 1999. 447 p. Russian.
20. Chernov DN. [Psychogenetic studies of speech and language abilities: The short review and studying prospects]. *Sovremennaya zarubezhnaya psikhologiya* [serial on the Internet]. 2014 [cited 2017 Jun 26]; 3 (2): 5–17. Available from: <http://psyjournals.ru/jmfp/2014/n2/70094.shtml> Russian.
21. Bronfenbrenner U, Ceci SJ. Nature-nurture reconceptualized in developmental perspective: A bio-ecological model. *Psychol Rev*. 1994 Oct; 101 (4): 568–86. PubMed PMID: 7984707.
22. Scarr S. Developmental theories for the 1990s: development and individual differences. *Child Dev*. 1992 Feb; 63 (1): 1–19. PubMed PMID: 1343618.
23. Rhemtulla M, Tucker-Drob EM. Gene-by-socioeconomic status interaction on school readiness. *Behav Genet*. 2012 Jul; 42 (4): 549–58. PubMed PMID: 22350185.
24. Tucker-Drob EM, Rhemtulla M, Harden KP, Turkheimer E, Fask D. Emergence of a gene × socioeconomic status interaction on infant mental ability between 10 months and 2 years. *Psychol Sci*. 2011 Jan; 22 (1): 125–33. PubMed PMID: 21169524.
25. Turkheimer E, Haley A, Waldron M, D'Onofrio B, Gottesman II. Socioeconomic status modifies heritability of IQ in young children. *Psychol Sci*. 2003 Nov; 14 (6): 623–8. PubMed PMID: 14629696.
26. Schwartz JA. Socioeconomic status as a moderator of the genetic and shared environmental influence on verbal IQ: A multilevel behavioral genetic approach. *Intelligence*. 2015 Sep–Oct; 52: 80–9.
27. Hart SA, Petrill SA, Deckard KD, Thompson LA. SES and CHAOS as environmental mediators of cognitive ability: A longitudinal genetic analysis. *Intelligence*. 2007 May–Jun; 35 (3): 233–42.
28. Tucker-Drob EM, Bates TC. Large cross-national differences in gene × socioeconomic status interaction on intelligence. *Psychol Sci*. 2016 Feb; 27 (2): 138–49. PubMed PMID: 26671911.
29. Petrill SA, Pike A, Price T, Plomin R. Chaos in the home and socioeconomic status are associated with cognitive development in early childhood: Environmental mediators identified in a genetic design. *Intelligence*. 2004 Sep–Oct; 32 (5): 445–60.
30. Stromswold K. Biological and psychosocial factors affect linguistic and cognitive development differently: A twin study. In: Bamman D, Magnitskaia T, Zaller C, editors. *BUCLD 30: Proceedings of the 30th annual Boston University Conference on Language Development*; 2005 Nov 4–6; Boston, USA. Somerville, MA: Cascadilla Press; 2006. p. 595–606.
31. Hart SA, Soden B, Johnson W, Schatschneider C, Taylor J. Expanding the environment: gene × school-level SES interaction on reading comprehension. *J Child Psychol Psychiatry*. 2013 Oct; 54 (10): 1047–55. PubMed PMID: 23725549.
32. Ravich-Shcherbo IV, Chernov DN. *Psikhogeneticheskoe issledovanie individual'nykh osobennostey rechi v mladshem shkol'nom vozraste*. *Zhurnal prikladnoy psikhologii*. 2005; (1): 21–9. Russian.
33. Rowe DC, Jacobson KC, Van den Oord EJ. Genetic and environmental influences on vocabulary IQ: Parental education level as moderator. *Child Dev*. 1999 Sep–Oct; 70 (5): 1151–62. PubMed PMID: 10546338.
34. Bates TC, Lewis GJ, Weiss A. Childhood socioeconomic status amplifies genetic effects on adult intelligence. *Psychol Sci*. 2013 Oct; 24 (10): 2111–6. PubMed PMID: 24002887.
35. Kremen WS, Jacobson KC, Xian H, Eisen SA, Waterman B, Toomey R, et al. Heritability of word recognition in middle-aged men varies as a function of parental education. *Behav Genet*. 2005 Jul; 35 (4): 417–33. PubMed PMID: 15971023.
36. Chernov DN. [Psychogenetic study of language competence's structure]. *Psikhologicheskie Issledovaniya* [serial on the Internet]. 2017 [cited 2017 Jun 26]; 10 (52): article 10 [about 7 p.]. Available from: <http://psystudy.ru/index.php/num/2017v10n52/1409-chernov52.html> Russian.
37. Mikhaylova NB. Adaptirovanny variant Geydel'bergskogo testa rechevogo razvitiya detey. *Psikhologicheskij zhurnal*. 1990; 11 (6): 105–12. Russian.
38. Maryutina TM. [Intermediate Phenotypes of intelligence in the context of genetic psychophysiology]. *Psikhologiya. Zhurnal Vysshey shkoly ekonomiki*. 2007; 4 (2): 22–47. Russian.
39. Searle SR. Phenotypic, genetic and environmental correlation. *Biometrics*. 1961 Sep; 17 (3): 474–80.
40. Scourfield J, Martin N, Eley TC, McGuffin P. The genetic relationship between social cognition and conduct problems. *Behav Genet*. 2004 Jul; 34 (4): 377–83. PubMed PMID: 15082935.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТОКСИКОЛОГИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЙ ПРИРОДЫ НА ГЕНОМЫ

С. А. Рыжкин^{1,2,3} ✉, А. Б. Маргулис², Б. М. Куриненко²

¹ Казанская государственная медицинская академия (филиал РМАНПО), Казань

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

³ Казанский государственный медицинский университет, Казань

Пациенты и медицинский персонал регулярно подвергаются воздействию ионизирующих излучений (ИИ), которые могут быть причиной различных генетических нарушений в организме. В статье рассматриваются возможности тестов, используемых для интегральной оценки воздействия ИИ на генетический аппарат клетки: теста Эймса, микроядерного теста, метода FISH. Описываются примеры их использования, разбираются достоинства и недостатки каждого подхода, оцениваются перспективы разработки новых методов оценки и требования к ним.

Ключевые слова: генетическая токсикология, рентгеновское излучение, ионизирующее излучение, тест Эймса, микроядерный тест, метод FISH

Финансирование: статья подготовлена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Республики Татарстан (проект № 16-16-16018).

✉ **Для корреспонденции:** Рыжкин Сергей Александрович
ул. Бутлерова, д. 36, г. Казань, 420012; rsa777@inbox.ru

Статья получена: 10.04.2017 **Статья принята к печати:** 25.05.2017

METHODS OF GENETIC TOXICOLOGY IN THE ASSESSMENT OF GENOMIC DAMAGE INDUCED BY ELECTROMAGNETIC IONIZING RADIATION

Ryzhkin SA^{1,2,3} ✉, Margulis AB², Kurinenko BM²

¹ Kazan State Medical Academy (branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education), Kazan, Russia

² Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

³ Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Medical or occupational exposure of patients and healthcare personnel to ionizing radiation (IR) can be a cause of genetic disorders. In this article we discuss the efficiency of the following tests used to comprehensively assess the effects of ionizing radiation on the genetic apparatus of a cell: the Ames test, the micronucleus test and the FISH method. We provide examples of their use, outline their advantages and drawbacks, estimate the possibility of designing more advanced test systems and discuss requirements for their implementation.

Keywords: genetic toxicology, X-ray radiation, ionizing radiation, gamma rays, test system, Ames test, micronucleus test, FISH

Funding: this work was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the Government of the Republic of Tatarstan (Project No. 16-16-16018).

✉ **Correspondence should be addressed:** Sergey Ryzhkin
ul. Butlerova, d. 36, Kazan, Russia, 420012; rsa777@inbox.ru

Received: 10.04.2017 **Accepted:** 25.05.2017

На геном живых организмов, в том числе ферменты, участвующие в синтезе и репарации ДНК, могут воздействовать как химические, так и физические факторы. Для оценки степени воздействия этих факторов используют одни и те же тесты, позволяющие в некоторых случаях определить мишень воздействия. Арсенал таких тест-систем разнообразен. В генетической токсикологии химических соединений тесты разделены на две группы. Тесты первой группы используют, как правило, для интегральной оценки генетической токсичности, проявляющейся мутациями или нарушением структуры ДНК. К тестам второй группы относят тесты, способные идентифицировать уникальную мишень воздействия, что позволяет предполагать механизм действия токсического агента.

Из физических факторов наибольшую значимость имеет ионизирующее излучение (ИИ) — излучение в виде

электромагнитных волн (гамма- и рентгеновское излучение) либо субатомных частиц (альфа-, бета-частиц, нейтронное излучение). ИИ, представленные электромагнитными волнами, в отличие от химических соединений ионизируют атомы молекул биологических объектов и среды в результате вторичных процессов, т. е. являются косвенно ионизирующими. Первичные процессы ионизации сопровождаются образованием свободных радикалов и перекиси водорода, которые и вступают в химические реакции с разнообразными молекулами биологической системы. Поэтому определить достоверно объект воздействия при лучевом повреждении генома организма невозможно. Однако с помощью анализа мутаций, стабильных и нестабильных хромосомных аберраций возможна интегральная оценка действия ИИ, совершенствование которой позволит выявлять индивидуальные особенности радиочувствительности

пациентов и персонала, выполняющего инвазивные вмешательства под контролем рентгеновского излучения. Это может быть использовано для планирования диагностики с применением современных дозообразующих технологий в лучевой диагностике и рентгеноэндovasкулярном лечении.

Тесты, используемые для интегральной оценки мутагенности ИИ

Тест Эймса

В тесте Эймса используются ауксотрофные по гистидину штаммы *Salmonella typhimurium*, которые под действием мутагенов способны ревертировать к прототрофности. В настоящее время тест Эймса усовершенствован: наряду с хорошо изученными мутациями, вызывающими потребность в гистидине, в геном сальмонеллы введена делеция по одному из генов репарации (*uvrB-bio*), что повышает чувствительность бактерий к мутагенам. Также в геном тест-штаммов введена мутация *rfa*, блокирующая синтез липополисахаридной капсулы, для повышения проницаемости клеток. Некоторые тест-штаммы *Salmonella typhimurium* несут плазмиду pKM 101, содержащую гены, повышающую чувствительность клеток к агентам, усиливающим рекомбинацию ДНК и индуцирующим SOS-мутагенез. Также благодаря данной плазмиде клетки тест-штаммов резистентны к ампициллину, что используется как маркер присутствия плазмиды [1].

В работе [2] тест Эймса использовали для оценки влияния на жизнеспособность и генотоксические эффекты облучения на рентгеновских компьютерных томографах в стандартных дозах от 4,4 до 74,5 мГр. Оценку мутагенности проводили на мутантном штамме *S. typhimurium TA 100 his G46, rfa, uvr-, pkm 101, bio*. В тесте на токсичность также использовали мутантный штамм *S. typhimurium TA 100*. О токсическом эффекте судили по выживанию тест-штамма в опытных (облученных) образцах по сравнению с контрольным. Было отмечено снижение числа колониеобразующих единиц (КОЕ) приблизительно в 5 раз для облученных вариантов.

Используя эту же бактериальную модель (*S. typhimurium TA 100*), проведено сравнение токсического и мутагенного эффекта при моделировании трех различных рентгенодиагностических процедур на рентгеновских аппаратах [3]. Из приведенных данных следует, что рентгеновская диагностика за исключением процедур, выполняемых на цифровых малодозовых аппаратах, оказывает токсическое и слабое мутагенное воздействие в тесте Эймса.

Мы полагаем, что дальнейший поиск новых тест-объектов на токсичность и мутагенность в качестве модельной системы перспективен для оценки степени обеспечения радиационной безопасности используемых режимов и методов рентгенодиагностики.

Тесты, используемые для интегральной оценки воздействия ИИ, основанные на анализе количества стабильных и нестабильных аберраций хромосом

Нестабильные аберрации хромосом лимфоцитов. Микроядерный тест

Микроядерный тест на клетках периферической крови (эритроцитах, лимфоцитах, буккальных клетках) используют для обнаружения структурных изменений (аберраций) хромосом. Хромосомные аберрации возникают в резуль-

тате разрыва ДНК. Микроядра представляют собой небольшие ДНК-содержащие образования, состоящие из ацентрических фрагментов хромосом, лишенных центромера, или отставших на стадии ана-/телофазы хромосом. На стадии телофазы эти фрагменты могут включаться в ядра дочерних клеток или образовывать одиночные или множественные микроядра в цитоплазме клеток [4].

Петрашова и соавт. [5] исследовали образцы лимфоцитов периферической крови и буккального эпителия горняков, работающих под землей в условиях повышенной концентрации радона. Используя этот тест, авторы установили увеличение числа двуядерных лимфоцитов с микроядрами у горняков со стажем 20–40 лет в 1,6–1,7 раза по сравнению с горняками с меньшим стажем. Анализ клеток буккального эпителия показал, что в опытной группе почти в 2 раза больше клеток с кариолизисом и в 20 раз — двуядерных клеток по сравнению с группой контроля. Эти результаты могут свидетельствовать о воздействии ионизирующей радиации на процесс цитокинеза, нарушение которого может приводить к появлению многоядерных клеток.

Нестабильные аберрации хромосом лимфоцитов периферической крови (образование дицентриков, ацентрических фрагментов и центрических колец) используются для оценки действия ионизирующего излучения при рентгенологических обследованиях населения, а также при скрининговом обследовании людей, подвергшихся облучению [6]. Количественные данные о показателях нестабильных аберраций, так называемой «биологической» дозе, несут информацию не только о результате радиационного воздействия на организм человека, но и о его индивидуальной радиочувствительности. Это позволяет более точно оценивать возможные ранние и отдаленные последствия облучения. Даже при самых низких дозах ионизирующего излучения (1 мГр и менее) при проведении рентгенологических исследований органов грудной клетки, пищевода, желудка в лимфоцитах периферической крови обследуемых лиц регистрируется повышенный уровень аберраций хромосом [7]. Именно показатели «биологической» дозы при низких дозах облучения активно обсуждаются [8, 9]. Более высокий уровень хромосомных аберраций в лимфоцитах периферической крови даже без клинических проявлений может свидетельствовать о развитии патологических процессов в организме человека.

Э. А. Демина [10] считает целесообразным при проведении скрининговых рентгенологических обследований отдельных контингентов населения для контроля лучевых нагрузок использовать методы биологической (цитогенетической) дозиметрии, для чего предлагается учитывать радиационно индуцированные аберрации хромосом после рентгенологического исследования в лимфоцитах периферической крови человека (*in vivo*) и *in vitro* — во флаконах с донорской кровью, размещенных в зонах риска пациента. При такой постановке контроля дозиметрическая информация будет получена путем моделирования условий облучения на тканеэквивалентном объекте. В своих исследованиях [11] авторы продемонстрировали эффективность такого моделирования при рентгенологическом обследовании органов грудной клетки и маммографии.

Идея постановки такого контроля представляется интересной, однако, на наш взгляд, она вызывает некоторые сомнения в плане снижения риска переоблучения. Во-первых, она ставится одновременно с рентгенологическим исследованием пациента. Данные, получаемые при параллельном облучении клеток крови, в том числе *in vitro*,

могут продемонстрировать превышение дозы (при условии наличия объективной калибровочной кривой «доза–эфф-фekt»), но пациент эту дозу уже получит. Во-вторых, контрольный образец лимфоцитов донорской крови *in vitro* может отличаться по радиочувствительности от организма облучаемого пациента (либо в сторону более высокой радиочувствительности, либо радиорезистентности). В-третьих, такой контроль рентгенодиагностической аппаратуры безусловно важен для оценки степени радиационной опасности рентгенологических обследований для пациентов. Однако мы полагаем, что для решения этой проблемы необходимы модели, обладающие стандартным ответом на облучение ИИ, и, кроме того, тестирование рентгенодиагностической аппаратуры для рентгенологических исследований должно проводиться с использованием этих моделей до обследования пациентов. Такой подход может обосновать не только необходимость снижения дозы облучения при сервисном техническом обслуживании рентгеновских аппаратов, но и разработку низкодозовых техник выполнения рентгенологических процедур, внедрение в практику технических решений по дальнейшей модернизации существующего парка рентгенодиагностической аппаратуры с целью снижения доз облучения пациентов и персонала.

Цитогенетические методы, основанные на анализе частоты нестабильных аберраций (дицентриков, ацентриков и центрических колец) используют для биологической индикации и дозиметрии ионизирующего излучения [12]. Подсчет частоты нестабильных аберраций лимфоцитов периферической крови, являющийся классическим методом, имеет целый ряд ограничений, однако несмотря на это используется для обследования людей, облученных ИИ.

Стабильные хромосомные аберрации в лимфоцитах крови. Метод FISH

К стабильным хромосомным аберрациям относятся симметричные транслокации, инсерции и инверсии. Их частота почти не меняется в течение длительного времени после облучения — месяцами, не редко годами. Во время клеточной пролиферации аберрации этого типа не элиминируются, клетки не погибают и, как следствие, сохраняются в процессе клеточного деления. Для анализа частоты транслокаций можно использовать метод G-дифференциального окрашивания. Для повышения его информативности анализируется каждая хромосома. Однако для этого требуется достаточно много времени и высокая квалификация специалистов даже при условии автоматического кариотипирования. Поэтому в настоящее время для анализа частоты транслокаций обычно используют метод FISH (fluorescent *in situ* hybridization). Принято считать, что метод FISH позволяет быстро и достоверно определять частоту аберраций и строить калибровочные кривые «доза–эффekt» для симметричных транслокаций.

Анализ стабильных аберраций при обследовании пациентов, прошедших курс лучевой терапии, а также пострадавших в результате атомной бомбардировки в Хиросиме [13], позволил получить данные, которые свидетельствуют о длительных сроках сохранения стабильных транслокаций. Установлено, что у таких пациентов частота симметричных транслокаций составляет около 90–95 %, она не менялась в течение десятилетий и коррелирует с дозой облучения. Это дает основание использовать анализ транслокаций для ретроспективной оценки доз ионизирующего излучения.

Достоинства и недостатки тестов

Таким образом, в настоящее время для диагностики лучевого воздействия на биологические объекты, а применительно к человеку — и определения тяжести этого воздействия, используются все варианты интегральной оценки действия ИИ на геном и клетку. Однако ни один из них не является идеальным. Так, например, мутации, оцениваемые по изменению фенотипических признаков вида, могут свидетельствовать об изменениях в геноме только после закрепления этих изменений у потомков, на что требуется длительное время. Тем не менее этот метод применим к растениям и мелким животным. Нестабильные аберрации хромосом, в частности, микроядерный тест, неспецифичен, т. к. не только ИИ, но и различные токсиканты также вызывают образование микроядер. Хотя по факту перенесенного облучения количество микроядер может свидетельствовать о тяжести лучевого поражения. Нестабильные аберрации, оцениваемые по количеству дицентриков, ацентриков и центрических колец, также не лишены недостатков, которые мы обсуждали выше. Однако изменение их количества можно использовать после острого однократного и относительно равномерного радиационного воздействия в ранние сроки. Наиболее распространен метод оценки изменений стабильных аберраций. Основное его достоинство в длительности сохранения аберраций. Оба варианта методов оценки стабильных аберраций — метод G-дифференциального окрашивания хромосом и метод FISH — используются для определения стабильных аберраций. Однако методами дифференциальной окраски нельзя обнаружить дополнительные участки, присоединенные к хромосоме, отсутствие какого-либо участка или его неправильное расположение, если длина участка меньше 3–5 % длины хромосомы [14]. Кроме того, метод трудоемок и требует высокой квалификации исполнителя. Метод FISH широко используется, обладает высокой разрешающей способностью, но трудоемок, требует специального оборудования и реактивов.

Актуальность использования методов генетической токсикологии для планирования лучевой диагностики и рентгеноэндovasкулярного лечения с применением современных дозообразующих технологий

На наш взгляд, следует отметить несколько важных моментов, связанных с использованием рентгеновского излучения в медицинской диагностике. Количество выполняемых медицинских рентгенологических процедур увеличивается [15], средние индивидуальные и коллективные дозы облучения населения при проверочной флюорографии, рентгенографических и рентгеноскопических процедурах чуть снизились [16]. Ранее мы отмечали, что внимания заслуживает организация мер радиационной безопасности в области инвазивных процедур, осуществляемых под контролем лучевых методов визуализации [17], а также доминирование компьютерной томографии (КТ) в формировании годовой коллективной эффективной дозы медицинского облучения [18].

Действительно, рентгеноэндovasкулярные методы диагностики и лечения показали свою высокую клиническую эффективность, однако дозы облучения пациентов при этом значительные [15]. То же самое касается КТ-процедур [18]. В работе [19] показано, что дозовая зависимость количества радиационно-индуцированных фокусов белков репарации ДНК характеризовалась повышением эффекта

в диапазоне 12–32 мГр. Подобный эффект отмечали и в других исследованиях влияния ионизирующего излучения, в том числе рентгеновского, в близких диапазонах доз [19]. Целый ряд КТ-процедур характеризуется такими дозами облучения. В этом контексте актуальным и перспективным направлением является разработка и совершенствование методов интегральной оценки действия ИИ на геном клеток критически важных органов пациента при облучении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходима разработка новых методов интегральной оценки действия ИИ электромагнитной природы, в том числе рентгеновского излучения, на геном клеток облучаемых

органов человека, которые бы позволили точно определять индивидуальные особенности радиочувствительности пациентов и персонала, выполняющего инвазивные вмешательства под контролем рентгеновского излучения, и могли быть использованы для безопасной диагностики различных заболеваний. Требования к таким методам определяются объектом и задачами исследования. Важно, чтобы они были доступными, требовали небольших затрат труда, времени и денег. К сожалению, пока метода, учитывающего все перечисленные требования, нет. Однако продолжать поиск в этом направлении, на наш взгляд, следует. Такие методы могли бы стать основой тест-систем, используемых в сервисном контроле технического состояния так называемой «тяжелой» техники для лучевой диагностики и рентгенэндоваскулярного лечения.

Литература

- Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 2010 Nov 20; 455 (1–2): 29–60.
- Маргулис А. Б., Рыжкин С. А., Слесарева А. Н., Белоногова Н. В., Пономарев В. Я., Ильинская О. Н. Генотоксические эффекты облучения на рентгено-компьютерных томографах. *Вестник Казанского технологического университета.* 2014; 17 (14): 380–2.
- Ryzhkin SA, Margulis AB, Belonogova NV, Ilinskaya ON. Comparative study of the X-ray diagnostic procedures safety using bacterial test-systems. In: Badalyan H, editor. *Proceedings of International workshop 'Ionizing and non-ionizing radiation influence on structure and biophysical properties of living cells'*; 2015 Sep 25–27; Tsakhkadzor, Armenia. *Armenian Journal of Physics.* 2016; 9 (1).
- Adler ID. Cytogenetic tests in mammals. In: Venitt S, Parry JM, editors. *Mutagenicity testing: practical approach.* Oxford: IRL Press; 1984. p. 275–306.
- Петрашова Д. А., Пожарская В. В., Белишева Н. К. Генотоксические эффекты природных источников ионизирующей радиации в лимфоцитах периферической крови и букальном эпителии горных рабочих. В сб.: VII съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиозоология, радиационная безопасность); 21–24 октября 2014 г.; Москва. М.: Изд-во РУДН; 2014. С. 84.
- Bonassi S, Kirsh-Volders M, Stromberg U, Vermuelen R, Tucker JD. Human population studies with cytogenetic biomarkers; review of literature and future prospectives. *Environ Mol Mutagen.* 2005 Mar–Apr; 45 (2–3): 258–70. DOI: 10.1002/em.20115.
- Ставицкий Р. В., редактор. *Медицинская рентгенология: технические аспекты, клинические материалы, радиационная безопасность.* М.: МНПИ; 2003. 344 с.
- Бурлакова Е. Б. Эффект сверхмалых доз. *Вестник РАН.* 1994; 64 (5): 425.
- Mothersill C, Seymour CB. Radiation-induced bystander effects - implications for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Feb; 4 (2): 158–64. DOI: 10.1038/nrc1277.
- Дёмина Э. А. Медицинские рентгенологические исследования и канцерогенные эффекты. *Проблемы радиационной медицины та радіобіології.* 2014; 19: 35–47.
- Domina EA. The radiobiological aspects of screening mammography: a reminder about possible distant negative effects. В сб.: *Международная конференция «Радиобиологические и радиозоологические аспекты Чернобыльской катастрофы»*; 11–15 апреля 2011 г.; Славутич, Украина. Славутич: Фітосоціоцентр; 2011. С. 28.
- Хвостунов И. К., Шепель Н. Н., Севаньяев А. В., Нугис В. Ю., Коровчук О. Н., Курсова Л. В. и др. Совершенствование методов биологической дозиметрии путем анализа хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека при облучении *in vitro* и *in vivo*. *Медико-биологические проблемы жизнедеятельности.* 2013; 1 (9): 135–47.
- Снигирева Г. П. Биологическая дозиметрия на основе цитогенетического анализа. *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии.* 2011; (11) [Интернет]. [процитировано: апрель 2017 г.] Доступно по ссылке: http://vestnik.mcrr.ru/vestnik/v11/papers/snigir2_v11.htm
- Колубаева С. Н. Использование цитогенетических методов в радиационной медицине. *Вестник Российской Военно-медицинской Академии.* 2008; 3 (23 Приложение 1): 179.
- Мозерова Е. Я. Новые источники малых доз радиации: результаты развития диагностической и терапевтической радиологии. *Радиационная гигиена.* 2012; 5 (2): 71–84.
- Рыжкин С. А., Иванов С. И., Пяташина М. А., Исмагилов Р. К., Аюпова Н. А., Логинова С. В. и др. Современные особенности формирования уровней медицинского облучения населения Республики Татарстан при выполнении рентгенологических процедур. *Радиационная гигиена.* 2015; 8 (1): 45–54.
- Рыжкин С. А., Шарафутдинов Б. М., Михайлов М. К. Опыт использования усовершенствованных методик при рентгенэндоваскулярных вмешательствах с целью снижения лучевых нагрузок на пациентов. *Вестник рентгенологии и радиологии.* 2017; 98 (1): 30–5.
- Валентин Д., редактор. *Радиационная защита в медицине.* СПб.: НИИ радиационной гигиены им. проф. П. В. Рамзаева; 2011. 66 с. Доступно по ссылке: <http://www.icrp.org/docs/P105Russian.pdf>
- Васильев С. А., Степанова Е. Ю., Кутенков О. П., Беленко А. А., Жаркова Л. П., Большаков М. А. и др. Двунитевые разрывы ДНК в лимфоцитах человека после однократного воздействия импульсно-периодического рентгеновского излучения в малых дозах: нелинейная дозовая зависимость. *Радиационная биология. Радиозоология.* 2012; 52 (1): 31–8.
- Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta. 2014; 17 (14): 380–2. Russian.
- Ryzhkin SA, Margulis AB, Belonogova NV, Ilinskaya ON. Comparative study of the X-ray diagnostic procedures safety using bacterial test-systems. In: Badalyan H, editor. *Proceedings*

References

- Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 2010 Nov 20; 455 (1–2): 29–60.
- Margulis AB, Ryzhkin SA, Slesareva AN, Belonogova NV, Ponomarev VYa, Ilinskaya ON. Genotoksicheskiye effekty oblucheniya na rentgeno-komp'yuternykh tomografakh. *Vestnik*

- of International workshop 'Ionizing and non-ionizing radiation influence on structure and biophysical properties of living cells'; 2015 Sep 25–27; Tsakhkadzor, Armenia. *Armenian Journal of Physics*. 2016; 9 (1).
4. Adler ID. Cytogenetic tests in mammals. In: Venitt S, Parry JM, editors. *Mutagenicity testing: practical approach*. Oxford: IRL Press; 1984. p. 275–306.
 5. Petrashova DA, Pozharskaya VV, Belisheva NK. Genotoksicheskiye efekty prirodnykh istochnikov ioniziruyushchey radiatsii v limfotsitakh perifericheskoy krovi i bukkal'nom epitelii gornyykh rabochikh. In: VII s'yezd po radiatsionnym issledovaniyam (radiobiologiya, radioekologiya, radiatsionnaya bezopasnost'); 2014 Oct 21–24; Moscow, Russia. Moscow: Izd-vo RUDN; 2014. p. 84. Russian.
 6. Bonassi S, Kirsh-Volders M, Stromberg U, Vermuelen R, Tucker JD. Human population studies with cytogenetic biomarkers; review of literature and future perspectives. *Environ Mol Mutagen*. 2005 Mar–Apr; 45 (2–3): 258–70. DOI: 10.1002/em.20115.
 7. Stavitskiy RV, editor. *Meditsinskaya rentgenologiya: tekhnicheskiye aspekty, klinicheskiye materialy, radiatsionnaya bezopasnost'*. Moscow: MNPI; 2003. 344 p. Russian.
 8. Burlakova EB. Effekt sverkhmalykh doz. *Vestnik RAN*. 1994; 64 (5): 425. Russian.
 9. Mothersill C, Seymour CB. Radiation-induced bystander effects - implications for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Feb; 4 (2): 158–64. DOI: 10.1038/nrc1277.
 10. Domina EA. Meditsinskiye rentgenologicheskiye issledovaniya i kantserogennyye efekty. *Problemi radiatsiynoi meditsini ta radiobiologii (Problems of radiation medicine and radiobiology)*. 2014; 19: 35–47. Ukrainian.
 11. Domina EA. The radiobiological aspects of screening mammography: a reminder about possible distant negative effects. In: *Mezhdunarodnaya konferentsiya 'Radiobiologicheskie i radioekologicheskie aspekty Chernobyl'skoy katastrofy'*; 2011 Apr 11–15; Slavutich, Ukrain. Slavutich: Fitosotsiotsentr; 2011. p. 28.
 12. Khvostunov IK, Shepel NN, Sevankayev AV, Nugis VYu, Korovchuk ON, Kursova LV et al. Sovershenstvovaniye metodov biologicheskoy dozimetrii putem analiza khromosomnykh aberatsiy v limfotsitakh krovi cheloveka pri obluchenii in vitro i in vivo. *Mediko-biologicheskiye problemy zhiznedeyatel'nosti*. 2013; 1 (9): 135–47. Russian.
 13. Snigiryova GP. [Biological dosimetry on the strength of cytogenetic analysis]. *Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii*. 2011; (11) [Internet]. [cited 2017 Apr] Available from: http://vestnik.ncrr.ru/vestnik/v11/papers/snigir2_v11.htm. Russian.
 14. Kolyubayeva SN. Ispol'zovaniye tsitogeneticheskikh metodov v radiatsionnoy meditsine. *Vestnik Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy Akademii*. 2008; 3 (23 Suppl 1): 179. Russian.
 15. Mozerova EYa. [New sources of low doses of radiation: results of development of diagnostic and therapeutic radiology]. *Radiation Hygiene*. 2012; 5 (2): 71–4. Russian.
 16. Ryzhkin SA, Ivanov SI, Patyashina MA, Ismagilov RK, Akopova NA, Loginova SV et al. [Modern peculiarities of the medical exposure levels forming of the tatarstan republic population during x-ray procedures implementation]. *Radiation Hygiene*. 2015; 8 (1): 45–54. Russian.
 17. Ryzhkin SA, Sharafutdinov BM, Mikhaylov MK. [Experience with different single-stage selective arterial catheterization procedures during x-ray endovascular interventions to reduce a radiation dose for patients]. *Vestnik rentgenologii i radiologii*. 2017; 98 (1): 30–5. Russian.
 18. Valentin D, editor. *Radiatsionnaya zaschita v meditsine*. Saint-Peterburg: NII radiatsionnoy gigieny im. prof. P.V. Ramzaeva; 2011. 66 p. Available from: <http://www.icrp.org/docs/P105Russian.pdf>. Russian.
 19. Vasilyev SA, Stepanova EYu, Kutenkov OP, Belenko AA, Zharkova LP, Bolshakov MA et al. Dvunitevyeye razryvy DNK v limfotsitakh cheloveka posle odnokrat-nogo vozdeystviya impul'sno-periodicheskogo rentgenovskogo izlucheniya v malykh dozakh: nelineynaya dozovaya zavisimost'. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2012; 52 (1): 31–8. Russian.