

умеренные корреляционные связи с длиной тела ( $r = 0,48$ ), поперечным диаметром груди ( $r = 0,45$ ), межжестистым ( $r = 0,39$ ) и межребневым ( $r = 0,39$ ) расстояниями, окружностью груди ( $r = 0,40$ ), индексом массы тела ( $r = 0,44$ ).

Наружная конъюгата формирует сильную корреляционную связь только с массой тела ( $r = 0,78$ ). Средние корреляционные связи образуются с межребневым ( $r = 0,54$ ) и межverteльным ( $r = 0,63$ ) расстояниями, с окружностями груди ( $r = 0,65$ ) и таза ( $r = 0,69$ ), с индексом массы тела ( $r = 0,64$ ). Умеренные корреляционные связи формируются с длиной тела ( $r = 0,48$ ), поперечным диаметром груди ( $r = 0,49$ ), межжестистым диаметром ( $r = 0,32$ ) и слабые с диаметром плеч ( $r = 0,16$ ).

Таким образом, размеры таза наиболее сильно коррелируют с массой тела, окружностью груди, и особенно, окружностью таза, а также с индексом массы тела и умеренно коррелируют с длиной тела, поперечным и продольным диаметрами груди, диаметром плеч, жировым и костным компонентами и индексом Рорера. Слабые корреляционные связи показали межжестистое и межребневое расстояния таза с переднезадним диаметром груди и наружная конъюгата с диаметром плеч.

### **КОРОТКИЕ АФП-ПОДОБНЫЕ МОТИВЫ ОНКОФЕТАЛЬНЫХ БЕЛКОВ КАК ВОЗМОЖНЫЕ СТРУКТУРНЫЕ МАРКЕРЫ ИХ ОБЩИХ ФУНКЦИЙ**

Терентьев А.А., Молдогазиева Н.Т.,  
Мохоосев И.М.

*Российский государственный медицинский  
университет, кафедра биохимии  
Москва, Россия*

В течение последнего десятилетия накоплены данные, свидетельствующие о наличии ряда важных общих свойств у онкофетальных белков, к которым принадлежит альфа-фетопротеин (АФП), и ряда полипептидных факторов роста. Во-первых, у этих двух групп негомологичных белков существует некоторые общие структурные особенности, например, высокое содержание остатков цистеина, включая наличие двоянных цистеинов. Во-вторых, факторы роста, как и АФП, способны регулировать пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз эмбриональных и опухолевых клеток, т.е. они могут рассматриваться в качестве онкофетальных белков.

При сравнительном анализе первичных структур факторов роста и АФП нами в составе последнего обнаружен структурный мотив, сходный с функционально важным участком (ЭФР) эпидермального фактора роста (Терентьев А.А. 1997). Последовательности LDSYQCT в составе АФП человека (а.о., аминокислотные остатки, 14–20) и LDKYACN в составе ЭФР человека (а.о. 26–32) обладают 57% идентичности и 86% общего сходства (с учетом консервативных замен

а.о.). Последовательность LDKYACN в составе ЭФР человека является важным компонентом основной  $\beta$ -складчатой структуры, входящей в состав петли В и содержит аминокислотные остатки, принимающие участие в связывании с рецептором (Ogiso, H. et al. 2002). Исходя из этого, можно предположить, что последовательность LDSYQCT в составе АФП также может являться частью его рецепторсвязывающего участка.

Длинные, содержащие примерно от 25 до 40 а.о., ЭФР-подобные модули были обнаружены в составе ряда мозаичных, мультимодульных белков, таких как факторы роста суперсемейства ЭФР, а также ряда белков клеточной адгезии, участвующих в регуляции эмбрионального развития и опухолевого роста. Было сделано предположение о том, что ЭФР-подобные модули этих белков могут играть роль сигналов, определяющих их участие в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток (Engel, J. 1989). Короткие гептапептидные мотивы, сходные с последовательностью LDSYQCT альфа-фетопротеина (или АФП-подобные мотивы), обнаружены нами в составе большинства таких ЭФР-подобных модулей и их повторов. Интересно, что в составе таких ЭФР-подобных модулей АФП-подобные мотивы обнаруживаются как в прямом, так и в инвертированном виде. Причем прямые и инвертированные мотивы связаны друг с другом через консенсусный октапептидный мотив, имеющий состав CXX-GY/FXGX. Короткие АФП-подобные мотивы, по-видимому, ответственны за наличие общих функций у онкофетальных белков, и могут рассматриваться в качестве структурных маркеров белков, регулирующих пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз эмбриональных и опухолевых клеток.

Факторы роста семейства эфр и их рецепторы

Эпидермальный фактор роста синтезируется в виде предшественника, большой молекулы, препро-ЭФР, состоящей из 1207 а.о., из которого образуется зрелая молекула (53 а.о.). Примечательно, что в состав предшественника входит восемь ЭФР-подобных модулей и гидрофобный участок, расположенный у С-конца, благодаря которому он может существовать в виде гликозилированного мембранного белка (Mroczkowski, B. et al. 1989).

Семейство эпидермального фактора роста, кроме самого ЭФР, включает TGF- $\alpha$ , амфигулин, гепаринсвязывающий ЭФР-подобный фактор роста, бетацеллюлин, эпирегулин, томорегулин и различные изоформы неурегулинов (NRG-1, NRG-2, NRG-3 и NRG-4). Все члены этого семейства обладают общностью строения, а именно их зрелые молекулы состоят примерно из 50-60 а.о. и содержат шесть остатков цистеина, образующих три внутримолекулярные дисульфидные связи (Savage, C.R. et al. 1973). Дисульфидные связи формируют три петли: А, В и С, которые образуются благодаря дисульфидным мостикам между С6-С20, С14-С31 и С33-С42, соответственно. Между петлями В и С находится шарнирный участок, образуемый в ЭФР

человека аминокислотным остатком N32. С помощью ЯМР спектроскопии показано, что все представители семейства ЭФР имеют сходную пространственную структуру, образуемую двумя частично перекрывающимися доменами: N-концевым, (а.о. 1-35) содержащим основную трехцепочечную антипараллельную  $\beta$ -складчатую структуру, и C-концевым (а.о. 30-53), содержащим минорную  $\beta$ -складчатую структуру. ЭФР осуществляет свое действие с участием мембранного рецептора, который принадлежит к семейству рецепторов ErbB. Это семейство у млекопитающих включает в себя четыре рецептора: ErbB1 (обозначаемый также РЭФР или HER1), ErbB2 (HER2/Neu), ErbB3 (HER3) и ErbB4 (HER4). Рецепторы данного семейства состоят из внеклеточного лиганд-связывающего домена, единственного гидрофобного трансмембранного домена и внутриклеточного домена, обладающего тирозинкиназной активностью. Внеклеточный домен РЭФР человека состоит из 619 а.о. и подразделяется на четыре субдомена, обозначаемые I, II, III и IV (Brown, P.M. et al. 1994; Olayioye, M.A. et al. 2000; Ward, C.W. et al. 1995).

Анализ кристаллической структуры комплекса ЭФР с его рецептором показывает, что в составе РЭФР можно выделить три участка взаимодействия с молекулой лиганда: участок 1 локализован в субдомене I рецептора, а участки 2 и 3 – в субдомене III. Петля В в составе ЭФР (а.о. 20-31) взаимодействует с участком 1, петля А (а.о. 6-19) и R41 в составе ЭФР взаимодействуют с участком 2, а C-концевая часть и R45 молекулы ЭФР – с участком 3. При этом наиболее важными для взаимодействия оказываются следующие а.о. в составе ЭФР:

1) в составе петли В – это M21, I23, L26 и A30, которые участвуют в гидрофобных взаимодействиях с участком 1 рецептора. Аминокислотный остаток N32 в составе ЭФР участвует в образовании водородных связей. Важность этих а.о. была подтверждена в экспериментах по мутагенезу ЭФР, показавших, что точечные замены этих а.о. приводят к уменьшению или потере связывающей способности.

2) А.о. H10, Y13 и L15 в составе петли А участвуют в образовании гидрофобных связей между ЭФР и участком 2 рецептора.

3) Третью группу составляют а.о. входящие в состав C-концевого участка ЭФР: это L47, участвующий в образовании гидрофобных взаимодействий с а.о. участка 3 рецептора, а также R41, Q43 и R45, которые, видимо, участвуют в образовании водородных связей.

#### Альфа-фетопротейн

Интенсивные исследования, осуществляемые в течение последнего десятилетия с целью выяснения биологической роли АФП и выявления его функционально важных участков, показали, что альфа-фетопротейн является мультимодульным и полифункциональным белком. В составе АФП обнаружено более двадцати коротких аминокислотных последовательностей, сходных с функционально важными участками

ряда физиологически активных белков, в том числе полипептидных факторов роста. Часть из этих последовательностей получена путем химического синтеза в виде отдельных пептидных фрагментов и изучена в различных тестах биологической активности. Выяснение и уточнение локализации таких пептидных сегментов с экспериментально подтвержденной или только предполагаемой функциональной активностью в полипептидной цепи АФП позволило создать его структурно-функциональную карту (Терентьев А.А., Молдогазиева Н.Т. 2006).

Важным из таких участков является гептапептид LDSYQCT (а.о. 14-20), сходный с частью рецепторсвязывающего участка ЭФР человека. Этот гептапептид был получен методом химического синтеза на твердой фазе и изучен нами в различных тестах биологической активности. Выяснилось, что синтетический пептид способен регулировать пролиферацию лимфоцитов периферической крови человека, активационный апоптоз клеток больных инфекционным миокардитом и бронхиальной астмой, а также поглощение глюкозы эритроцитами больных сахарным диабетом.

Обнаружение афп-подобных мотивов в белках, ассоциированных с эмбрио- и канцерогенезом

#### *Прямые АФП-подобные мотивы*

Как уже упоминалось ранее, нами в составе домена I АФП и петли В ЭФР человека обнаружены сходные структурные мотивы. Это последовательности LDSYQCT в составе АФП (а.о.14–20) и LDKYACN в составе ЭФР человека (а.о. 26–32). С использованием программы для локального выравнивания FASTA из базы данных первичных структур белков Swiss-Prot/TrEMBL нами были извлечены последовательности, содержащие аналогичные мотивы, обозначенные как АФП-подобные мотивы. Такие мотивы были обнаружены нами также в составе других факторов роста семейства ЭФР, а также ЭФР-подобных модулей факторов роста суперсемейства ЭФР. АФП-подобные мотивы обнаружены также в составе трансформирующих факторов роста TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 человека. Это последовательности LDTNYCF (а.о. 2-8 в составе TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2) и LDTQYSK в составе TGF- $\beta$ 1 (а.о. 54-60). Следовательно, в составе АФП и факторов роста суперсемейств ЭФР и TGF- $\beta$ , неродственных и негомологических белков, обнаруживаются сходные мотивы, что указывает на существование структурных предпосылок для наличия у них общих функциональных свойств.

Интересно, что ЭФР-подобные мотивы обнаружены в составе белков, регулирующих процессы клеточной адгезии и миграции, имеющие важное значение в эмбрио- и канцерогенезе. К таким белкам, например, относятся лактадгерин человека (FPSYTCST, а.о. 27-33), белок Notch дрозофилы (INGYNCS, а.о. 720-726) и др.

#### *Инвертированные АФП-подобные мотивы*

Структурные мотивы, сходные с АФП-подобными мотивами, но уже в инвертированном виде, обнаруживаются в составе ряда белков семейства ЭФР.

Это последовательности RCENADL (а.о. 40-46) в составе TGF- $\alpha$ , RCERVDL (а.о. 40-46) в составе бетацеллюлина, PCRDKDL (а.о. 5-11) в составе NRG-3, а также RCQYRDL (а.о. 41-47) в составе самого ЭФР человека. При этом прямые и инвертированные мотивы оказываются связанными через октапептидный мотив, общая формула которого для разных последовательностей определена как CXXGY/FXGX. Как продемонстрировано ниже инвертированные мотивы также могут содержать а.о. необходимые для связывания с рецептором, т.е. могут иметь важное функциональное значение.

*Возможное функциональное значение АФП-подобных мотивов*

Как уже описывалось ранее, последовательность LDKYACN в составе ЭФР человека (а.о. 26–32) содержит аминокислотные остатки, участвующие в связывании с рецептором. Это L26, A30 и N32, образующие гидрофобные и водородные связи с рецептором. На основании сравнения АФП-подобных мотивов различных белков, можно сделать предположение о том, что аминокислотные остатки в их составах также могут участвовать во взаимодействии с рецептором. Так, сравнение последовательностей LDSYQCT в составе АФП (а.о.14–20) и LDKYACN в составе ЭФР человека (а.о. 26–32) показывает, что аминокислотным остаткам L26 и A30 соответствуют L14 и Q18 в составе АФП человека, которые также способны участвовать в гидрофобных взаимодействиях. А остатку N32 соответствует T20, гидроксильная группа которого также может участвовать в образовании водородных связей.

Четыре из семи а.о. инвертированного АФП-подобного мотива RCQYRDL (а.о. 41-47) в составе ЭФР человека, а именно R41, Q43, R45, L47 участвуют во взаимодействии с рецептором. Если сравнивать прямой и инвертированный мотивы ЭФР человека (LDKYACN и RCQYRDL), то L47 соответствует L26, Q43 соответствует A30, а R41 – N32, и боковые цепи этих а.о. участвуют в образовании гидрофобных или водородных взаимодействий. Видимо, взаимодействие ЭФР с его рецептором осуществляется, в основном, без участия СО- и NH-групп остова полипептидной цепи, т.е. направление полипептидной цепи не имеет значения. В этом случае можно предполагать, что инвертированные последовательности, обнаруженные в составе других факторов роста семейства ЭФР, также могут принимать участие в связывании с рецептором.

Таким образом, альфа-фетопротеин, факторы роста суперсемейств ЭФР и TGF- $\beta$ , а также ряд белков клеточной адгезии и миграции демонстрируют ряд сходных структурно-функциональных свойств, среди которых, в первую очередь, хотелось бы выделить наличие сходных пептидных мотивов, в том числе и в инвертированном виде. Наличие сходных гептапептидных мотивов создает структурные предпосылки для существования общих функциональных свойств у этих групп неродственных и негомологичных белков. Можно предположить, что наличие АФП-подобных мотивов

может служить структурным маркером участия белков в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки, миграции и апоптоза как эмбриональных, так и опухолевых клеток.

### **ПОКАЗАТЕЛИ МИКРОФЛОРЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ У БЕЛЫХ МЫШЕЙ, ПОЛУЧАВШИХ МЕТОТРЕКСАТ: ДОЗОЗАВИСИМОСТЬ ЭФФЕКТА И ВЛИЯНИЕ ПУТЕЙ ВВЕДЕНИЯ**

Шитов Л.Н.

*ГОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия Росздрава»*

*Ярославль, Россия*

Метотрексат является антиметаболитом – структурным аналогом фолиевой кислоты, обладает цитостатическим действием, а также вызывает выраженную иммуносупрессию. При проведении цитостатической и иммуносупрессивной терапии часто возникают инфекционные осложнения, среди возбудителей которых преобладают условно-патогенные микроорганизмы, в том числе представители нормальной микрофлоры организма человека: стафилококки, кишечные палочки, энтерококки, дрожжеподобные грибы рода *Candida* и др. Описан энтероколит, развивающийся у крыс при однократном введении метотрексата в дозе 20 мг/кг (Мао Y. et al., 1996). В соответствии с вышесказанным, важным направлением исследований является изучение влияния метотрексата на состояние микрофлоры, в частности, микрофлоры толстой кишки, играющей чрезвычайно важную роль в жизнедеятельности организма и находящейся в тесной взаимосвязи с состоянием иммунной системы.

Представленного исследования – оценка влияния метотрексата на некоторые показатели микробиоценоза толстой кишки белых беспородных мышей при различных дозах и способах введения препарата.

Исследования микрофлоры кишечника проводены на белых беспородных мышцах-самках массой  $30 \pm 3$  г. Контрольные и опытные группы состояли из 10 животных. Использован препарат Веро-метотрексат, 1%-ный раствор натриевой соли метотрексата для инъекций (ЗАО «Верофарм», Москва). Пути введения – внутрижелудочный и внутрибрюшинный. Внутрижелудочное введение препарата осуществляли с помощью атравматического зонда. В соответствии с рекомендациями «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Москва, 2000) дозы, применяемые у человека, увеличивали в 11,8 раза. Дозы метотрексата составили 1,33, 1,67 и 2,67 мг/кг. Введение препарата осуществляли через день в течение двух недель. Мыши контрольных групп получали 0,5 мл дистиллированной воды. Исследование микрофлоры проводили через 2 недели после начала введения, использовали питательные среды производства ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (г. Оболensk). Оценивали сум-