

4. Marconi S., Angelucci R., Errichetti M. et. al. Humic acids from compost in antimutagenesis processes in soil // Fresenius Environ. Bull. – 2004. – Vol.13, № 12a. – P.1395-1397.
5. Ferrara G., Loffredo E., Senesi N., Marcos R. Humic acids reduce the genotoxicity of mitomycin C in the human lymphoblastoid cell line TK6 // Mutat. Res. – 2006. – 603, № 1. – P.27-32.
6. Use of *Saccharomyces cerevisiae* D7 to analysis of genotoxicity/antimutagenicity of processed humic acids / Kubešová J., Turková V., Mikulcová A., Kučerík J., Márová I., Pekař M. // 34<sup>th</sup> Annual conference on yeast. Praha, 10-12 May 2006. – 2006. – P. 1186.
7. Cozzi R., Nicolai M., Perticone P., De Salvia R., Spuntarelli F. Desmutagenic activity of natural humic acids: inhibition of mitomycin C and maleic hydrazide mutagenicity // Mutat. Res. – 1993. – 299, № 1. – P.37-44.
8. Bernacchi F., Ponzanelli I., Minunni M., Falezza A., Loprieno N., Barale R. In vivo cytogenetic effects of natural humic acid // Mutagenesis. – 1996. – 11, № 5. – P.467-9.
9. Zhou S.W., Xu F.D., Li S.M., Song R.X., Qi S., Zhang Y., Bao Y.P. Major origin of mutagenicity of chlorinated drinking water in China: humic acid or pollutants // Sci. Total. Environ. – 1997. – 196, № 3. – P.191-196.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.

### Резюме

Досліджували вплив гумату натрію (100 мг/л) на цитогенетичні ефекти тиофосфаміду (1 мг/л) в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa* L. При дії тиофосфаміду спостерігається зменшення МІ, дезінтеграція пулів мітотичних клітин кореневої меристеми, збільшення частоти аберантних клітин ( в 14,41 разів порівняно з контролем). Гумат натрію повністю інгібував мітотоксичність тиофосфаміду та на 39,9% зменшував частоту аберантних клітин, індукованих мутагеном.

Исследовали влияние гумата натрия (100 мг/л) на цитогенетические эффекты тиофосфамида (1 мг/л) в клетках корневой меристемы *Allium cepa* L. При действии тиофосфамида наблюдается уменьшение МИ, дезинтеграция пулов митотических клеток корневой меристемы, увеличение частоты аберантных клеток ( в 14,41 раз в сравнении с контролем). Гумат натрия полностью ингибировал митотоксичность тиофосфамида и на 39,9% уменьшал частоту аберантных клеток, индуцированных мутагеном.

Investigated influence of sodium humate (100 mg/l) on cytogenetic effects of tiophosphamide (1 mg/l) of cells root meristem *Allium cepa* L. At action of tiophosphamide reduction MI, decomposition of pools mitotic cells root meristem, increase in frequency aberrant cells (in 14,41 times in comparison with the control) is observed. Sodium humate completely inhibit mitotoxic of tiophosphamide and on 39,9 % reduces frequency aberrant cells induced of mutagens.

**БАРХАШ А.В.<sup>1</sup>, ПЕРЕЛЫГИН А.А.<sup>2</sup>, КОБЗЕВ В.Ф.<sup>1</sup>, ПИЛИПЕНКО П.И.<sup>3</sup>, МЯСНИКОВА Н.Г.<sup>4</sup>, МОРОЗОВА О.В.<sup>5</sup>, БРИНТОН М.А.<sup>2</sup>, РОМАЩЕНКО А.Г.<sup>1</sup>, ВОЕВОДА М.И.<sup>1,6</sup>**

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева, 10, e-mail: [barkhash@rambler.ru](mailto:barkhash@rambler.ru)

<sup>2</sup> Университет штата Джорджия, Атланта, США,

<sup>3</sup> Новосибирский государственный медицинский университет, 630091, Новосибирск, Красный пр-т, 52

<sup>4</sup> Муниципальный научно-практический неврологический центр, 630054, Новосибирск, ул. Костычева, 4

<sup>5</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева, 8

<sup>6</sup> ГУ НИИ терапии СО РАМН, 630089, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

## ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ 2'-5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТСИНТЕТАЗ ЧЕЛОВЕКА И ИХ СВЯЗЬ С ТЯЖЕЛЫМИ ФОРМАМИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Клещевой энцефалит (КЭ) – трансмиссивное природно-очаговое заболевание, вызываемое нейротропным РНК-содержащим вирусом из рода флавивирусов. Ежегодно регистрируется до 11000 случаев заболевания в России и до 3000 случаев в других европейских странах (Gritsun et al., 2003). В Сибирском федеральном округе эпидемиологическая ситуация по КЭ считается неблагоприятной - уровень заболеваемости более чем в 5 раз превышает среднероссийский (Онищенко и др., 2007).

Одна из характерных особенностей КЭ - сильно различающиеся клинические проявления заболевания: от легкой лихорадочной формы до тяжелых форм с поражением центральной нервной системы. У значительного числа индивидуумов заражение вирусом КЭ протекает бессимптомно (Иерусалимский, 2001). Предполагается, что развитие у человека определенной формы КЭ зависит в значительной степени от его врожденной степени восприимчивости к данному вирусу, т.е. от комбинации аллелей определенных генов человека, прямо или косвенно участвующих в защитных противовирусных реакциях организма.

Ранее было показано, что степень восприимчивости некоторых линий мышей к флавивирусам зависит от присутствия в геноме конкретных вариантов гена *oas1b* из семейства генов, кодирующих 2'-5'-олигоаденилатсинтетазы (2-5OAS). У восприимчивых линий мышей по сравнению с устойчивыми линиями образуется укороченный на 30% белок из-за нонсенс-мутации в 4-ом экзоне этого гена, приводящей к образованию терминирующего кодона (Perelygin et al., 2002; Mashimo et al., 2002). Поэтому гены, кодирующие 2-5OAS (*OAS*-гены), были выбраны в качестве генов-кандидатов для определения возможных факторов наследственной восприимчивости/устойчивости человека к КЭ.

*OAS*-гены относятся к индуцируемым интерферонами генам и являются важнейшим звеном ранней внутриклеточной противовирусной защитной реакции организма (Samuel, 2001). 2-5OAS, используя в качестве субстрата АТФ, катализируют полимеризацию АМФ с образованием 2'-5'-олигоаденилатов (2-5A), которые взаимодействуют с латентной эндорибонуклеазой L (RNASEL) и вызывают ее димеризацию и активацию. Активированная RNASEL гидролизует одноцепочечные РНК, что приводит к деградации как клеточной, так и вирусной РНК и к подавлению размножения вируса (Justesen et al., 2000). Активность 2-5OAS многократно увеличивается в присутствии двухцепочечной РНК, появляющейся в пораженных вирусом клетках.

У человека известно 3 *OAS*-гена, продукты которых обладают соответствующей ферментативной активностью - *OAS1*, *OAS2* и *OAS3*, расположенные кластером на хромосоме 12. Они кодируют разные формы 2-5OAS-белков - малую, среднюю и большую. Несмотря на относительное структурное сходство ферментов, они отличаются компарментализацией в клетке, конформацией и количеством дцРНК, необходимым для их активации. Кроме этих генов, описан ген *OAS-Like*, локализованный также на хромосоме 12 и высокогомологичный им, но продукт которого не обладает ферментативной активностью (Novanessian, Justesen, 2007; Justesen et al., 2000).

Известны отдельные разрозненные исследования по установлению генетических основ восприимчивости человека к КЭ (Иерусалимский, 2001; Гончарова и др., 2006; Бархаш и др., 2006; Kindberg et al., 2008). В данной работе нами в качестве генетических маркеров были выбраны 23 однонуклеотидных полиморфизма (ОНП), локализованные в различных районах внутри генов *OAS1* (6 ОНП), *OAS2* (8), *OAS3* (7) и *OAS-Like* (2). Настоящее исследование посвящено изучению возможного влияния выбранных ОНП *OAS*-генов на клинические особенности течения КЭ у человека.

### Материалы и методы

Были исследованы образцы ДНК не родственных между собой русских жителей г. Новосибирска, перенесших КЭ и проходивших лечение в стационарах (преимущественно в 2002-2007 гг.). Всего было изучено 142 образца ДНК пациентов, перенесших различные формы КЭ, из которых 38 человек – перенесших лихорадочную форму (ЛФ) КЭ, 64 – менингеальную форму (МФ) КЭ и 40 – тяжелые формы (ТФ) КЭ, включая менинго-энцефалитическую, полиоэнцефалитическую и менинго-энцефало-полиомиелитическую. Для минимизации влияния внешних факторов на фенотипические проявления заболевания (клиническую форму) использовали образцы ДНК только тех лиц, которые не подвергались вакцинации до начала заболевания или введению гамма-глобулина после укуса клещом. В качестве контрольной группы использовали популяционную выборку русских жителей г. Новосибирска (265 человек).

Выделение ДНК из крови проводили с помощью депротеинизации фенолом и хлороформом. Для определения генотипов использовали метод дискриминации аллелей с помощью TaqMan-наборов (Applied Biosystems, США), а также ПЦР и последующий рестрикционный анализ.

Сравнение частот генотипов и аллелей между выборками по каждому из изученных ОНП проводили по критерию  $\chi^2$  с помощью программы SPSS 11.0. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости  $P < 0.05$ .

### **Результаты и обсуждение**

Первичный скрининг для определения возможной связи выбранных ОНП с особенностями течения КЭ был проведен с использованием образцов ДНК перенесших КЭ в 2002-2005 гг. (91 человек, из которых 31 – ЛФ, 34 – МФ и 26 – ТФ). Были определены частоты генотипов и аллелей по каждому из 23 ОНП у больных ТФ по сравнению с больными ЛФ, МФ и объединенной группой больных ЛФ+МФ. Далее по тем из ОНП, для которых были выявлены статистически достоверные различия ( $P < 0.05$ ) по частотам определенных генотипов и/или аллелей между группами, для подтверждения полученных результатов были дополнительно изучены образцы ДНК перенесших КЭ в 2006-2007 гг. (51 человек, из которых 7 – ЛФ, 30 – МФ и 14 – ТФ).

Поскольку все исследованные пациенты не были иммунизированы, то лиц, перенесших ТФ с поражением структур спинного и головного мозга, мы рассматриваем как генетически предрасположенных к КЭ, а лиц, перенесших более легкие лихорадочную и менингеальную формы - как относительно генетически устойчивых к КЭ.

В образцах ДНК пациентов 2002-2007 гг. статистически достоверных различий по частотам генотипов и аллелей ОНП генов *OAS1* и *OAS-Like* между больными ТФ и больными ЛФ, МФ, ЛФ+МФ, а также контролем выявлено не было. Достоверные различия были обнаружены для 5-ти ОНП, локализованных в пределах генов *OAS2* и *OAS3*: 3-м ОНП гена *OAS2* - rs1293762, rs15895 и rs1732778, и 2-м ОНП гена *OAS3* - rs2285932 и rs2072136. При этом для ОНП rs1732778 гена *OAS2* и rs2072136 гена *OAS3* были выявлены высокодостоверные различия ( $P < 0.01$ ) по определенным генотипам или аллелям.

ОНП rs1293762 гена *OAS2* располагается в середине 2-ого интрона, вдали от сайтов сплайсинга мажорных изоформ мРНК. ОНП rs1732778 располагается в 3'-фланкирующей области гена *OAS2*. Поэтому их возможная роль не ясна. Возможно, что эти ОНП входят в состав каких-то регуляторных элементов; не исключено также, что они могут быть сцеплены с каким-то иным функционально значимым полиморфизмом. ОНП rs15895 гена *OAS2*, локализованный в 11-ом экзоне гена *OAS2*, в случае аллеля А приводит к образованию стоп-кодона трансляции, а в случае аллеля G – к триптофану в позиции 720 изоформы p71 белка и к удлинению его на 8 аминокислот.

ОНП rs2285932 (Ple438Ple) и rs2072136 (Ser567Ser) располагаются соответственно в 6-ом и 8-ом экзонах гена *OAS3*; замены являются синонимичными. Вопрос о значении таких ОНП до конца не ясен. Можно предположить, что синонимичная замена в

кодирующей части гена оказывает влияние на регуляцию пост-транскрипционных событий с предшественниками мРНК.

#### **Выводы**

Таким образом, для 5-ти из 23 изученных ОНП *OAS*-генов выявлены статистически достоверные различия по определенным генотипам и/или аллелям между больными ТФ и больными ЛФ, МФ, ЛФ+МФ и/или контролем. Эти результаты с увеличением выборки образцов ДНК больных сохраняются. Выявленные генетические различия среди больных с различными клиническими формами КЭ свидетельствуют о влиянии этих 5-ти ОНП *OAS*-генов на формирование индивидуальной восприимчивости к вирусу КЭ у русских.

#### **Литература**

1. Бархаш А.В., Кобзев В.Ф., Пилипенко П.И., Богданова Ю.О., Морозова О.В., Ромащенко А.Г., Воевода М.И. Изучение возможной связи полиморфизмов интерферон-индуцируемых генов человека *OAS1*, *OAS3*, *EIF2AK2* и *RNASEL* с особенностями течения клещевого энцефалита // Информационный вестник ВОГиС.- 2006.- Т.10, №3.- С.565-571.
2. Гончарова И.А., Фрейдин М.Б., Рудко А.А., Напалкова О.В., Колоколова О.В., Ондар Э.А., Дунаева Л.Е., Белобородова Е.В., Пузырев В.П. Геномные основы подверженности к инфекционным заболеваниям // Информационный вестник ВОГиС.- 2006.- Т. 10, №3.- С.540-552.
3. Иерусалимский А.П. Клещевой энцефалит (Руководство для врачей). - Новосибирск: Государственная медицинская академия МЗ РФ.- 2001.- 360с.
4. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Пакскина Н.Д. Организация надзора за клещевым вирусным энцефалитом и меры по его профилактике в Российской Федерации // Вопросы вирусологии.- 2007.- Т. 52, № 5.- С.8-10.
5. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis // Antiviral Research.- 2003.- Vol. 57, № 1-2.- P.129-146.
6. Hovanessian A.G., Justesen J. The human 2'-5' oligoadenylate synthetase family: Unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation // Biochimie.- 2007.- Vol. 89, Issues 6-7.- P.779-788.
7. Justesen J., Hartmann R., Kjeldgaard N.O. Gene structure and function of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase family // Cellular and Molecular Life Sciences.- 2000.- Vol. 57, № 11.- P.1593-1612.
8. Kindberg E., Mickiene A., Ax C., Akerlind B., Vene S., Lindquist L., Lundkvist A., Svensson L. A deletion in the chemokine receptor 5 (CCR5) gene is associated with tickborne encephalitis // Journal of Infectious Diseases.- 2008.- Vol. 197, № 2.- P.266-269.
9. Mashimo T., Lucas M., Simon-Chazottes D., Frenkiel M.P., Montagutelli X., Ceccaldi P.E., Deubel V., Guenet J.L., Despres P. A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice // PNAS.- 2002.- Vol.99, № 18.- P.11555-11557.
10. Pereygin A.A., Scherbik S.V., Zhulin I.B., Stockman M., Li. Y., Brinton M.A. Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene // PNAS.- 2002.- Vol. 99, № 14.- P. 9322-9327.
11. Samuel C.E. Antiviral actions of interferons // Clinical Microbiology Reviews.- 2001.- Vol. 14, № 4.- P.778-809.

#### **Резюме**

Определены частоты генотипов по 23-м ОНП 4-х *OAS*-генов у неиммунизированных больных различными формами клещевого энцефалита. Обнаружены статистически достоверные различия между больными тяжелыми и легкими формами по частотам генотипов 5-ти ОНП генов *OAS2* и *OAS3*; вероятно, эти ОНП оказывают влияние на формирование предрасположенности к вирусу клещевого энцефалита у русских.

Genotypic frequencies for 23 SNPs of *OAS*-genes were estimated in samples of the nonimmunized tick-borne encephalitis patients with different clinical manifestations. Statistically significant differences of genotype frequencies for 5 *OAS3* and *OAS2* gene SNPs between patients with severe and mild forms of the disease were detected; we suggest that these SNPs may influence on the susceptibility to tick-borne encephalitis virus at Russians.

**БІЛОШИЦЬКА А.В.,<sup>1</sup> ПІСКУН Р.П.,<sup>1</sup> ГОРБАТЮК С.М.,<sup>1</sup> МРИХ Н.М.,<sup>1</sup>  
БІЛОШИЦЬКИЙ В.В.,<sup>2</sup> ПІСКУН І.І.,<sup>1</sup> РОМАШКІНА О.А.,<sup>1</sup> ЦИБА Л.О.,<sup>3</sup> ШЕВЧУК  
Т.І.<sup>1</sup>**

*1- Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова  
Україна, 21018, Вінниця, вул. Пирогова, 56, e-mail: piskyn2006@mail.ru*

*2- Інститут нейрохірургії АМН України*

*3- Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного, 150*

### **МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ГЕННОЇ ТЕРАПІЇ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ**

Загальновідомий тісний взаємозв'язок між розвитком серцево-судинних розладів, дисліпідемій і проявами змін у внутрішніх органах. Так, дисліпідемії та атеросклероз є важливими етіологічними факторами порушення мозкового кровотоку та причиною виникнення інсульту [2;7]; атеросклероз – ключовий елемент в розвитку ішемічної хвороби серця і окклюзивних захворювань судин, що є причиною порушення коронарного кровообігу та виникнення інфаркту міокарда [1;5]; дисліпідемії часто зустрічаються у хворих хронічною нирковою недостатністю, а ліпідний профіль сироватки крові в значній мірі залежить від рівня клубочкової фільтрації і ступеня протеїнурії [4]; ожиріння, артеріальна гіпертензія і дисліпідемії проявляються неалкогольною жировою хворобою печінки і в даний час розглядаються як печінкова маніфестація метаболічного синдрому [10]; дисліпідемія викликає ендотеліальну дисфункцію, що погіршує обмінні процеси в щитоподібній залозі, що проявляється зниженням її функціональної активності [11]. Профілактика атеросклерозу входить в загальнодержавні медичні рекомендації більшості країн, а програмою корекції дисліпідемій, прийнятою ВООЗ, керується весь світ. До арсеналу терапії дисліпідемій відносяться препарати різних фармакологічних груп: ентеросорбенти, статини, фібрати, похідні ксантинів тощо, але, на жаль, жоден з них не задовольняє потреби практичної медицини, бо кожен діє лише на одну певну ланку патогенезу дисліпідемій та атеросклерозу. При прояві клінічних ознак атеросклерозу можна загальмувати його прогресування, а в деяких випадках, і викликати зворотній розвиток атеросклеротичних змін. Для цього використовують засоби, які знижують вміст холестерину ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) і підвищують рівень ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) сироватки крові.

Відомо, що атеросклероз відноситься до мультифакторіальної патології, до розвитку якої, поряд з впливом навколишнього середовища, призводить спадковість. Ось чому чисельні клінічні та експериментальні способи профілактики та лікування цієї хвороби при використанні фармакологічних препаратів, що знижують рівень холестеролу, тригліцеридів та ЛПНЩ у крові, виявили, що це лише тимчасовий ефект - тільки під час прийому ліків [9]. В той же час немає надійних засобів, що збільшували б рівень антиатерогенних ЛПВЩ [3].

Результати великої кількості популяційних, клінічних та експериментальних досліджень свідчать, що існує зв'язок між наявністю мутацій окремих генів та порушеннями ліпідного обміну. Завдяки успіхам молекулярної біології було доведено, що однією з причин порушень ліпопротеїдного обміну є мутації гена Апо-Е – гена головного