



Высокоспецифичные видовые праймеры к генам *Nat1* и *Nat2* для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных

Н.Н.Каркищенко, Н.В.Петрова, В.В.Слободенюк

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: Каркищенко Николай Николаевич scbmt@yandex.ru

Работа посвящена изучению N-ацетиляционного полиморфизма, определяющего устойчивость к токсичности лекарств и онкологическим процессам, связанным с ароматическими и гетероциклическими аминами. Осуществлен биоинформационный анализ последовательностей генов *NAT1* и *NAT2* у людей, а также лабораторных животных. Сконструированы наиболее перспективные нуклеотидные последовательности мишеней, для использования в синтезе видоспецифичных праймеров для ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Проведены молекулярно-генетические исследования экспрессии генов *NAT1* и *NAT2* на уровне мРНК у людей пяти разных популяционных групп, а также мышей, крыс и кроликов методом ОТ-ПЦР. Получены видоспецифичные праймеры для ОТ-ПЦР у людей и лабораторных животных для оптимизации экстраполяционных биомodelей полиморфизма по *NAT1* и *NAT2*, а также для изучения механизмов сегрегации индивидуумов в медленные, средние или быстрые ацетиляторные фенотипы людей. В проведенной ПЦР мышей, крыс и кроликов было выявлено наличие высокоспецифичных участков гена и *NAT1* и *NAT2*. Первым этапом настоящих исследований стало получение реальных биомodelей и создание высокоспецифичных видовых праймеров к генам *NAT1* и *NAT2*. Это позволяет создать фундамент для экстраполяции получаемых в эксперименте данных в отношении человека.

Ключевые слова: N-ацетилтрансфераза (*NAT1*, *NAT2*), экспрессия генов *NAT1* и *NAT2*, олигонуклеотидные праймеры, биомodelи ацетиляторного полиморфизма человека, лабораторные модели.

Процессы ферментативного ацетилирования ароматических аминов как у прокариотов, так и у эукариотов осуществляется с помощью N-ацетилтрансфераз (*NAT*). Этот процесс заключается в переносе ацетильных групп либо на амидную группу, либо на ОН-группу молекул субстратов. Абсолютное количество субстратов *NAT* является ксенобиотиками, мно-

гие из которых используются в качестве лекарственных средств. Чуть ли не единственным эндогенным субстратом *NAT1* является пара-аминобензоилглутамат, являющийся продуктом катаболизма фолиевой кислоты [7, 15, 16, 22].

Ферментативная активность *NAT* может изменяться в результате химической модификации находяще-

invitrogen.com/site/us/en/home.html), DNASTAR, BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>).

Экстракцию РНК из плазмы крови людей, а также лабораторных животных проводили с помощью комплекта реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «Ампли-Прайм РИБО-сорб» (АмплиСенс, г. Москва). Для реакции обратной транскрипции применяли комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L» (АмплиСенс, г. Москва).

Синтез олигонуклеотидных праймеров и детекция экспрессии генов. Для детекции экспрессии генов *NAT1* и *NAT2* на уровне мРНК у людей и разных видов лабораторных животных использовали специфические олигонуклеотидные праймеры (табл.1-3).

Синтез праймеров осуществлялся на автоматическом синтезаторе ДНК ASM-800 амидофосфитным методом.

Амплификация генов *Nat1* и *Nat2*. Стадию амплификации проводили в 25 мкл смеси: ПЦР Буфер (×10): 700 mM Трис-НCl, pH 8,6 / 25 °C, 166 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, *Taq* - полимеразы, на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Россия).

Для амплификации фрагментов гена *NAT1* применяли условия проведения реакции: 95 °C – 15 мин., затем 35 циклов: 94 °C – 30 сек., 54 °C – 30 сек., 72 °C – 30 сек., в конце 72 °C – 5 мин. и охлаждение до 6 °C с последующим хранением при 10 °C.

Для амплификации фрагментов *NAT2* гена применяли условия проведения реакции: 95 °C – 15 мин., затем 35 циклов: 94 °C – 30 сек., 52 °C – 30 сек.,

72 °C – 30 сек., в конце 72 °C – 5 мин. и охлаждение до 6 °C с последующим хранением при 10 °C.

После амплификации 6 мкл образца смешивали с 6 кратным буфером для загрузки и вносили в 2% агарозный гель (0,5 мкг/мл ЭБР). Электрофорез проводили при 50 А, 100 В на 1 см² в течение 30 минут. Продукты амплификации визуализировали при помощи системы ChemiDoc MP (Bio-Rad, США).

Результаты исследований

В результате проведенных исследований по биоинформационному анализу олигонуклеотидных последовательностей генов *NAT1* и *NAT2*, депонированных в электронной базе данных NCBI Gen Bank были отобраны наиболее перспективные последовательности праймеров для мишеней. Исследование будущей структуры олигонуклеотидных праймеров для ПЦР проводили на отсутствие внутренней вторичной структуры (отсутствие само- и взаимнокомплиментарности), отсутствие комплиментарности между 3'-концами (праймер-димеров, шпикл).

Для подбора и исследования оптимальных концентраций компонентов, учитывая их стоковые концентрации и параметры синтезированных олигонуклеотидных праймеров, была проведена компоновка вариантов реакционных смесей ПЦР с термостабильной *Taq*-полимеразой. Исследование концентраций реакционных смесей позволило установить оптимальный вариант, в котором концентрация фермента составила 1,5 ед. на пробу. Такая концентрация лежит

в диапазоне 0,5-5,0 ед., что не приводит к уменьшению специфичности реакции. Концентрация праймеров от 10 до 15 пМ, что уменьшает вероятность возникновения неспецифического отжига праймеров и накоплению неспецифического продукта.

Рабочая концентрация свободных ионов Mg^{2+} составляет 2,5 mM в реакции, при данной концентрации не происходит ингибирование фермента полимеразы на 40-50% и не наблюдается неспецифических продуктов амплификации. Концентрация каждого dNTP в пределах 80 μ M. Уменьшение концентрации dNTP до такого предела допустимо, при котором происходит сохранение свободных ионов Mg^{2+} , поддерживающих активность фермента полимеразы на должном уровне, что, в свою очередь, не приводит к снижению отжига олигонуклеотидных праймеров и, как следствие, уменьшению выхода специфического продукта.

При проведении подбора расчетным путем оптимальной температуры отжига олигонуклеотидных праймеров и зондов, согласно соотношению оснований G/C и A/T их нуклеотидной последовательности для ПЦР была установлена средняя температура отжига праймеров для гена *NAT1* – 54 °C; для *NAT2* – 52 °C.

Учитывая размер амплифицируемых фрагментов в ПЦР было подобрано оптимальное время продолжительности этапов денатурации, отжига и элонгации – 30 сек, 30 сек и 30 сек соответственно.

Для молекулярно-генетического исследования экспрессии генов *NAT1* и *NAT2* на уровне мРНК нами производилось выделение тотальной РНК из

образцов материала лабораторных животных: кроликов, крыс и мышей. Полученную тотальную РНК подвергали реакции обратной транскрипции для получения кДНК, применяемой в дальнейшей реакции ПЦР со специфическими праймерами (табл. 1-4). По истечении амплификации 10 мкл ампликонов смешивали с 6 кратным буфером для загрузки и вносили в 2% агарозный гель (0,5 мкг/мл ЭБР). Размер амплифицируемого продукта определяли с помощью маркера длин фрагментов 1000-50 п.н. в концентрации 0,5 мкг/мкл в буфере для нанесения на гель.

Специфичность ПЦР оценивалась по соответствию размера продуктов амплификации с размером, определенным каждой паре праймеров генов *NAT1* и *NAT2* конкретного лабораторного животного.

Видовые праймеры к генам *Nat1* и *Nat2* у лабораторных мышей

Таблица 1
Праймеры для видового типирования генов *NAT1* и *NAT2* у мышей

Олигонуклеотидные праймеры мыши	Размер продукта (пар нуклеотидов)
N1musF GTYTRCTTTMAWTCTGHTTG N1musR CACYATCMACCWCTYTTCTT	433
N2musF TTGWGAGRAAGAAGYGGRGT N2musR TGYCRAACGGAAGWTGGCAG	484

На рис.1 представлена электрофореграмма продуктов амплификации участков генов *NAT1* и *NAT2* у мышей.

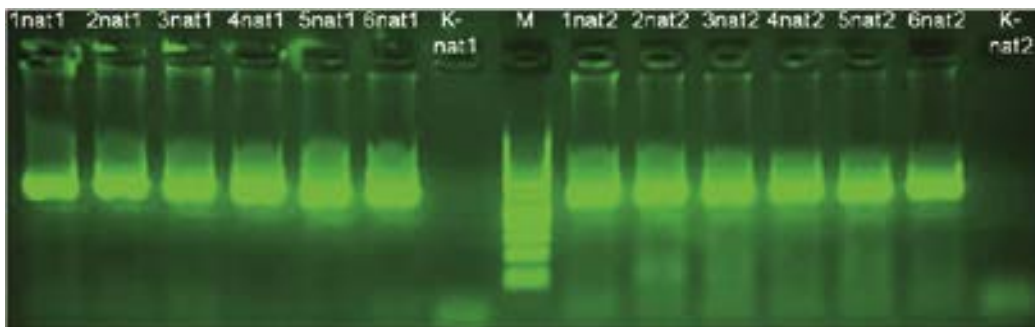


Рис. 1. Электрофоретический спектр продуктов амплификации с праймерами N1mus и N2mus. Обозначения: М – маркер длин фрагментов от 50 до 1000 пар нуклеотидов; 1nat1–6nat1 треки продуктов амплификации гена *NAT1* мышей с соответствующими праймерами N1musF/N1musR; K-nat1, K-nat2 – отрицательные контроли; 1nat2–6nat2 – треки продуктов амплификации гена *NAT2* мышей с соответствующими праймерами N2musF/N2musR.

Для нас существенно важным было установление отсутствия неспецифических продуктов реакции. Важно также то, что амплификация проходила только с наработкой специфических фрагментов, соответствующих заявленным размерам (табл. 1). Это говорит о высокой видовой специфичности подобранных праймеров к генам *NAT1* и *NAT2* исследованных линий мышей. В то же время было выявлено наличие специфичных участков гена *NAT1* и *NAT2* у каждой мыши, вне зависимости от того, к какой линии они относились.

Видовые праймеры к генам *Nat1* и *Nat2* у лабораторных крыс

На рис.2 представлена электрофореграмма продуктов амплификации участков генов *NAT1* и *NAT2* у крыс.

Проведенные ПЦР-исследования не выявили у крыс неспецифических продуктов реакции. В амплификации нарабатывались исключительно специфические фрагменты (табл. 2). Индивидуальные показатели каждой из крыс выявили специфичные участки генам *NAT1* и *NAT2*. Это также подтверждает

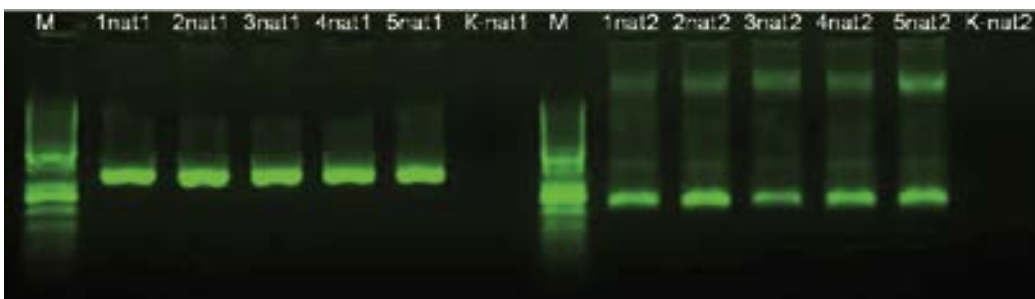


Рис 2. Электрофоретический спектр продуктов амплификации с праймерами N1rat и N2rat. Обозначения: М – маркер длин фрагментов от 50 до 1000 пар нуклеотидов; 1nat1–5nat1 треки продуктов амплификации гена *NAT1* крыс с соответствующими праймерами N1ratF/N1ratR; K-nat1, K-nat2 – отрицательные контроли; 1nat2–5nat2 – треки продуктов амплификации гена *NAT2* крыс с соответствующими праймерами N2ratF/N2ratR.

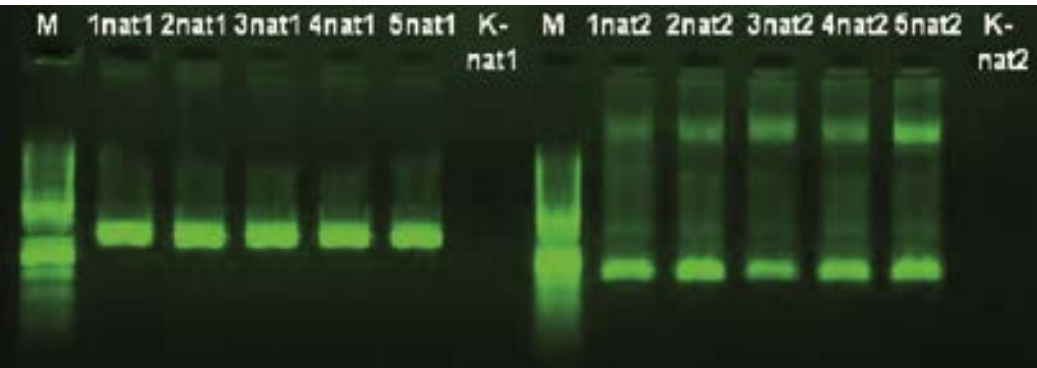


Рис. 4. Электрофоретический спектр продуктов амплификации с праймерами N1hom и N2hom. Обозначения: М – маркер длин фрагментов от 50 до 1000 пар нуклеотидов; 1nat1–5nat1 треки продуктов амплификации гена *NAT1* человека с соответствующими праймерами N1homF/N1homR; K-nat1, K-nat2 – отрицательные контроли; 1nat2–5nat2 – треки продуктов амплификации гена *NAT2* человека с соответствующими праймерами N2homF/N2homR.

Таблица 4
Праймеры для типирование генов
NAT1 и *NAT2* у человека

Олигонуклеотидные праймеры человека	Размер продукта (пар нуклеотидов)
N1homF AAGYTGTGMGAAGAAMTCGG N1homR ACTGTTCCCTTCTGATTTGG	333
N2homF GRACCWAAYCAGGAGARAGC N2homR AGSCCACCACAWACAGYAAACC	227

Важная роль феномена ацетилирования у людей при различных социально-значимых болезнях, применении лекарственных средств различных групп и показаний, а также выявление роли ксенобиотиков на здоровье специальных контингентов и населения в целом делает проблему изучения роли N-ацетилтрансфераз весьма актуальной и животрепещущей.

Обсуждение результатов

Наиболее широко в литературе представлены данные исследований, посвященных изучению роли полиморфизма ацетилирования при развитии онкологических заболеваний легких и кишечника [8, 28], ревматоидном артрите [2323], а также при анализе фармакокинетики и гепатотоксичности различных препаратов [17, 20]. Известно, что в зависимости от особенностей фенотипа ацетилирования люди делятся на 3 типа: «быстрые» ацетиляторы, «промежуточные» и «медленные» [14]. У «медленных» ацетиляторов обнаруживается повышенная чувствительность не только к изониазиду, но и к сульфаниламидам, ариламинам, гидразинам, к некоторым антиаритмическим и другим препаратам.

Механизм токсического действия препаратов связан с медленным выведением лекарств из-за сниженной скорости ацетилирования, а, следовательно, и выведения препарата, происходит накопление препарата. При носительстве двух «медленных» аллелей гена *NAT2* продуцируется фермент с пониженной

активностью, вследствие чего повышена чувствительность организма к воздействию ароматических аминов.

При носительстве хотя бы одного «быстрого» аллеля продуцируется фермент с повышенной активностью, из-за чего повышена чувствительность к воздействию гетероциклических аминов. При носительстве двух «медленных» аллелей гена *NAT2* увеличен риск развития онкологических заболеваний, вызываемых воздействием ароматических аминов, особенно рака мочевого пузыря, а также повышается риск побочных эффектов при приеме стандартных доз прокаиамида.

Вызывает удивление, что вопросам выяснения механизмов нарушения и даже особенностей *NAT*-ацетилирования уделяется столь малое значение. Отсутствие реальных биологических моделей этих процессов, протекающих у человека, серьезно тормозит дальнейший прогресс в распознавании интимных процессов, протекающих при развитии онкологических заболеваний, гепатотоксичности, ревматоидных болезнях, заболеваний дыхательной и желудочно-кишечной системы. Поэтому первым этапом настоящих исследований стало получение реальных биомоделей и создание высокоспецифичных видовых праймеров к генам *NAT1* и *NAT2*. Эти исследования были бы неполными без оценки соответствующих процессов у людей. Только сочетание этих исследований позволяет создать фундамент для экстраполяции получаемых в эксперименте данных в отношении человека.

В соответствии с целями и задачами, определенными в данной работе, нами установлено следующее. В результате

проведенной ПЦР неспецифических продуктов реакции не наблюдалось, амплификация проходила только с наборкой специфических фрагментов, что говорит о высокой видовой специфичности подобранных праймеров к генам *NAT1* и *NAT2* исследуемых лабораторных животных (мыши, крысы, кролики). У каждого лабораторного животного было выявлено наличие специфичных участков гена *NAT1* и *NAT2*. Аналогичные данные получены у 27 пациентов, не имеющих генетических патологий и относящихся к разным популяционным группам.

Нашим дальнейшим движением в этом направлении является изучение генов N-ацетилтрансферазы (*Nat1* и *Nat2*) у различных лабораторных животных с целью исследования полиморфизма генов, с использованием метода ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов ДНК), что позволит потенциально выявить ферментативную активность на уровне целостного организма. Мы надеемся, что это позволит выявить у животных некоторые аллели, наиболее близкие к таковым у человека.

Список литературы

1. Каркищенко В.Н., Мартынов В.В. Фармакология, генополиморфизм и клонирование генов *NAT* у человека и животных-моделей // Биомедицина, № 4 2006, с. 85.
2. Aguiar F.A., Malvar Ddo C., Vaz Ade L., Calixto L.A., Clososki G.C., de Gaitani C.M., de Souza G.E., Jabor V.A. Simultaneous determination of dipyrone metabolites in rat hypothalamus, cerebrospinal fluid and plasma samples by LC-MS/MS //

- Bioanalysis. 2013. 21: 2631-2645.
3. **Atmane N., Dairou J., Paul A., Dupret J.M., Rodrigues-Lima F.** Redox regulation of the human xenobiotic metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1 (*NAT1*). Reversible inactivation by hydrogen peroxide // J Biol Chem. 2003. 278: 35086–35092.
4. **Bell D.A., Stephens E.A., Castranio T., Umbach D.M., Watson M., Deakin M., Elder J., Hendrickse C., Duncan H., Strange R.C.** Polyadenylation polymorphism in the acetyltransferase 1 gene (*NAT1*) increases risk of colorectal cancer // Cancer Res. 1995. 55: 3537–3542.
5. **Bell D.A., Taylor J.A., Butler M.A., Stephens E.A., Wiest J., Brubaker L.H., Kadlubar F.F., Luder G.W.** Genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (*NAT2*) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans // Carcinogenesis. 1993. 14 (8): 1689-1692.
6. **Bősze Zs., Houdebine L.M.** Applications of Rabbits in Biomedical Research: Review. // World Rabbit Sci., 2006, 14, 1-14. WRSA, UPV, 2003.
7. **Butcher N.J., Minchin R.F.** Arylamine N-Acetyltransferase 1: A Novel Drug Target in Cancer Development // Pharmacol Rev. 2012. 64:147–165.
8. **Cai J., Zhao Y., Zhu C.L. et al.** The association of *NAT1* polymorphisms and colorectal carcinoma risk: evidence from 20 000 subjects. Mol. Biol. Rep. 2012; 39 (7): 7497–7503.
9. **Cascorbi I., Roots I., Brockmoller J.** Association of *NAT1* and *NAT2* Polymorphisms to Urinary Bladder Cancer: Significantly Reduced Risk in Subjects with *NAT1*10* // Cancer Reserch. 2001. V. 61. P. № 1. 5051–5056.
10. **Dairou J., Atmane N., Dupret J.M., Rodrigues-Lima F.** Reversible inhibition of the human xenobiotic-metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1 by S-nitrosothiols // Biochem Biophys Res Commun. 2003. 307: 1059–1065.
11. **Dairou J., Atmane N., Rodrigues-Lima F., Dupret J.M.** Peroxynitrite irreversibly inactivates the human xenobiotic-metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1 (*NAT1*) in human breast cancer cells: a cellular and mechanistic study // J Biol Chem. 2004. 279: 7708–7714.
12. **Dairou J., Malecaze F., Dupret J.M., Rodrigues-Lima F.** The xenobioticmetabolizing enzymes arylamine N-acetyltransferases in human lens epithelial cells: inactivation by cellular oxidants and UVB-induced oxidative stress // Mol Pharmacol. 2005. 67: 1299–1306.
13. **Deitz A.C., Zheng W., Leff M.A., Gross M., Wen W.Q., Doll M.A., Xiao G.H., Folsom A.R., Hein D.W.** N-Acetyltransferase-2 Genetic Polymorphism, Well-done Meat Intake, and Breast Cancer Risk among Postmenopausal Women // Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 2000. 9: 905–910.
14. **Hein D.W., Doll M.A.** Accuracy of various human *NAT2* SNP genotyping panels to infer rapid, intermediate and slow acetylatorphenotypes. Pharmacogenomics. 2012; 13 (1): 31–41.
15. **Jensen L.E., Hoess K., Mitchell L.E., Whitehead A.S.** Loss of function polymorphisms in *NAT1* protect against spina bifida // Hum Genet. 2006. 120:52–57.

Поиск синтетических антикоагулянтов – ингибиторов сериновых протеаз: сочетание *in silico* и *in vitro* методов

Н.И. Баранова, П.А. Алексеева, К.С. Чистяков, В.Н. Юсковец,
С.В. Оковитый, А.В. Бурякина, Е.В. Федорова

ГБОУ ВПО Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург

Контактная информация: к.х.н. Федорова Елена Викторовна,
elena.fedorova@pharminnotech.com

В работе представлен модельный подход, основанный на интеграции расчётной теории (*in silico*-экспериментов) и экспериментов, поставленных *in vitro* к поиску, оптимизации и созданию новых молекул, обладающих сродством к семейству сериновых протеаз.

Авторы выражают признательность компании Novartis AG за помощь в проведении экспериментов *in vitro* в рамках программы «Novartis in-kind collaborations», а также персональную благодарность их научным сотрудникам-биологам Ulrich Hassiepen и Gabriela Monnet.

Ключевые слова: количественные соотношения структура-активность (QSAR), молекулярный докинг, ингибиторы сериновых протеаз, каскад свертывания, высокопроизводительный скрининг.

Цель

Применение комбинированного подхода, основанного на сочетании *in silico* и *in vitro* методов при поиске потенциальных ингибиторов сериновых протеаз.

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания и их осложнения занимают первое место в мире среди причин смерти людей. Одним из основных компонентов схем лечения ишемической болезни сердца, острого коронарного синдрома, тромбозов при травмах, трансплантации, крупных хирургических вмешательствах является антикоагулянтная терапия.

Среди мишеней для действия потенциальных антикоагулянтов одними из наиболее перспективных являются

сериновые протеазы системы свертывания крови. В клинической практике широко применяются пероральные ингибиторы Ха фактора (ривароксабан, аписабан) и Па фактора (дабигатрана этексилат). Интерес также представляет поиск новых антикоагулянтов в ряду ингибиторов таких сериновых протеаз, как фактор VIIa, IXa, XIa, XIIa, калликреин.

Сочетание *in silico* и *in vitro* методов на ранних этапах скрининга активных молекул значительно повышает результативность поиска новых лекарственных средств. [1]. Поскольку методы прогнозирования требуют подтверждения их достоверности с помощью исследования на биообъектах, например, с помощью высокопроизво-

дительного скрининга на изолированных ферментах [2]. Совместное использование хемоинформатических и биологических методов скрининга позволяет снизить расходы на синтетические и аналитические исследования, так как дает возможность исследовать соединения уже на этапе виртуальных молекул.

В настоящей работе использован рациональный модельный подход, основанный на интеграции расчётной теории и эксперимента *in vitro* для поиска новых синтетических ингибиторов сериновых протеаз каскада свертывания.

Материалы и методы

Объекты исследования

Объектами исследования служили органические соединения, синтезированные на кафедрах неорганической химии (Баранова Н.С., заведующий кафедрой - профессор Москвин А.В.) и органической химии (Юсковец В.Н., заведующий кафедрой – профессор Яковлев И.П.), относящиеся к производным пиримидинов, арил- и алкиламидинов и 1,3,4-оксадиазолов.

Дизайн эксперимента

Компьютерное выявление активных структур проводили, используя комбинированный *in silico/in vitro* подход, включавший следующие этапы:

- препроцессинг собственной базы соединений - удаление структур, не удовлетворяющих правилу Липинского (drug likeness) [3];
- постпроцессинг соединений с использованием неспецифических моделей активностей соединений на базе PASS online и их токсичности на базе GUSAR online;

- скрининг потенциальных лигандов на специфическую активность (ингибирование IIa, VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa факторов и калликреина) с помощью QSAR-моделей;
- молекулярный докинг структур с оценкой значения скоринг-функции и характера взаимодействия белок-лиганд;
- высокопроизводительный скрининг *in vitro* на изолированных компонентах свертывания крови человека (факторы свертывания IIa, VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa, калликреин) с помощью хромогенных субстратов;
- выбор соединений-лидеров.

Исследование *in silico*

Для прогнозирования профилей биологической активности в виде MOL-файлов были представлены структурные формулы 1104 химических соединений, относящиеся к производным пиримидинов, арил- и алкиламидинов и 1,3,4-оксадиазолов.

Препроцессинг баз данных был основан на допустимых значениях оценок физико-химических свойств (так называемый drug-likeness) - липофильности, допустимому интервалу молекулярной массы, количеству доноров и акцепторов водородной связи, значению молярной рефракции (правило Липинского), а также числу свободных ротационных связей.

Постпроцессинг осуществляли, анализируя предсказанные спектры активности и токсичности соединений с использованием Интернет-ресурсов PASS-online и GUSAR-online (Pharmaexpert.ru). Соединения отбрасывали в том случае, если $P_a > P_i$

для нежелательных эффектов (мутагенность, тератогенность, канцерогенность, раздражающее действие), а также расчётное значение LD_{50} составляло менее 15 мг/кг для перорального введения.

На следующем этапе проводили скрининг потенциальных лигандов на специфическую активность с помощью QSAR-моделей в программе GUSAR (General Unrestricted Structure-Activity Relationships), созданной с использованием среды программирования Delphi 5.0 Professional. Нами были созданы модели количественного соотношения между химической структурой и значением полуингибирующей концентрации на следующие мишени: IIa, VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa факторы свертывания и калликреин. Устойчивость и репрезентативность моделей оценивали по объёму ($V > 5$) и значениям коэффициентов корреляции ($R^2 > 0,7$ и $Q^2 > 0,6$).

Молекулярный докинг проводили, используя программу предсказания белок-лигандных взаимодействий FlexX [4]. Критерием оценки взаимодействия между исследуемыми соединениями и мишенью служила величина оценочной функции (скоринг-функция), выраженная в ккал/моль и определяемая как энергия взаимодействия лиганда с ферментом. Также учитывали пространственный характер связывания вещества с мишенью посредством образования связей с ключевыми аминокислотами в сравнении с известными агонистами или антагонистами.

Исследование in vitro

В экспериментах были использованы IIa и Xa факторы (Hematologic Technolo-

gies Inc., США), фактор VIIa (Novo Nordisk Pharma AG, Швейцария), факторы XIa, XIIa и калликреин плазмы (Kordia, Нидерланды), фактор IXa (Cellscience, США).

Все растворы белков и пептидов хранили в силиконизированных пробирках (Life Systems Design, Швейцария). Растворы исследуемых соединений переносили в 384-луночные планшеты с общим объемом лунки 25,25 мкл (Labsystems Oy, Финляндия) с помощью CyBi-Hummingwell дозатора (CyBio AG, Германия). Растворы ферментов и субстратов добавляли в планшеты с помощью CyBi-well 384-канального дозатора (CyBio AG, Германия).

Измерение проводили при комнатной температуре в 384-луночных планшетах. Исследуемые вещества растворяли в смеси ДМСО-вода в соотношении 9:1. Предварительно в каждую лунку помещали по 250 нл раствора исследуемого вещества и 12,5 мкл раствора фермента в буфере. После преинкубации в течение 70 мин при комнатной температуре реакцию запускали добавлением 12,5 мкл раствора соответствующего субстрата. Влияние вещества на активность фермента определяли как линейную часть логарифмической кривой и фиксировали через 1 час. Конечные концентрации исследуемых веществ в растворе составляли от 1 нМ до 100 мкМ.

Измерение проводили на планшетном спектрофотометре Ultra reader (TECAN, Швейцария). Для возбуждения флуоресценции красителя Rh110 использовали фильтр с длиной волны 485 нм, испускаемое свечение регистрировали при длине

волны 535 нм. Для повышения соотношения сигнал-шум использовали дихроические зеркала. Все флуорофоры возбуждали тремя вспышками на одно измерение.

Значения IC_{50} рассчитывали как отношение процента ингибирования к ингибирующей концентрации по следующей формуле:

$$y = A2 + (A1 - A2) / (1 + (x / IC_{50}) ^ p),$$

где Y – процент ингибирования при ингибирующей концентрации x

A1 – минимальное значение ингибирования

A2 – максимальное значение ингибирования

p – коэффициент Хилла

Расчёт и обработку кривых производили методом нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения Helios.

Таблица 1

Условия проведения анализа

Мишень	Фермент	Субстрат	Концентрация фермента, нМ	Концентрация субстрата, мкМ	Состав буферного раствора
Фактор IIa	Тромбин человека (фактор IIa)	Bz-Val-Pro-Arg-Rh110-D-Pro	0,4	0,5	50 мМ HEPES, 50 мМ NaCl, 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4
Фактор VIIa	Фактор VIIa, человека, рекомбинантный	dPhe-Pro-Arg-Rh110-D-Pro	15	0,5	100 мМ HEPES, 140 мМ NaCl, 5 мМ CaCl ₂ , 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4
Фактор IXa	Нативный фактор IXa, очищенный, из плазмы человека	dLeu-Gly-Arg-Rh110-D-Pro	20	0,5	50 мМ Трис, 125 мМ NaCl, 5 мМ CaCl ₂ , 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4
Фактор Xa	Фактор Xa человека	Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-Rh110-γGlu	0,625	0,5	50 мМ HEPES, 50 мМ NaCl, 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4
Фактор XIa	Фактор XIa человека	dLeu-Pro-Arg-Rh110-γGlu	0,5	0,5	50 мМ HEPES, 125 мМ NaCl, 5 мМ CaCl ₂ , 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,4
Фактор XIIa	Фактор XIIa человека	dPro-Phe-Arg-Rh110-γGlu	1,5	0,5	50 мМ HEPES/NaOH, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,8
Калликреин	Калликреин плазмы человека	dPro-Phe-Arg-Rh110- γGlu	0,025	0,5	50 мМ Hepes/HCl, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,05 % (м/о) CHAPS, pH 7,8

Примечание: HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота, CHAPS - 3-[(3-холамидопропил)диметиламмония]-1-пропансульфонат.

Результаты и их обсуждение

Исходная база соединений содержала 1104 объекта, принадлежащих к классам гетеро- и алициклических органических соединений – производных, арил- и алкиламидинов и 1,3,4-оксадиазолов. Выявления активных структур компьютерными методами проводили, применяя комбинированный *in silico/in vitro* подход, который включал в себя несколько этапов (рис. 1).

После первичного скрининга с использованием правила Липинского было отобрано 48 соединений. Пример

процедуры препроцессинга представлен в таблице 2.

Соединение с шифром 122.NB.0114 не удовлетворяет правилу Липинского по параметру «число акцепторов водородной связи», которое не должно превышать 5. Анализ данных постпроцессинга позволил отсеять потенциально токсичные вещества [5]. Пример данных постпроцессинга представлен в таблице 3.

В таблице указаны два соединения, отсеянные на этапе постпроцессинга: с шифрами 247.NB.0114 и 018.NB.0114,

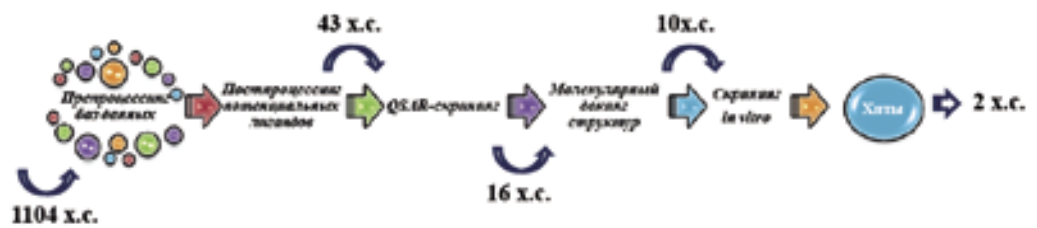


Рис. 1. Блок-схема этапов комбинированного *in silico/in vitro* подхода.

Таблица 2

Пример анализа данных при препроцессинге

Вещество	Число свободных ротационных связей	logP	Число доноров водородной связи	Число акцепторов водородной связи	Молярная масса, г/моль	Молярная рефракция, см²
247.NB.1213	1	3,82	1	3	247,1	57,3
122.NB.0114	2	0,875	1	6	223,2	54,796
093.NB.0114	2	2,52	2	3	194,2	49,4

Таблица 3

Пример анализа данных при постпроцессинге

Вещество	LD ₅₀ GUSAR, мг/кг, крысы п/о	Вероятность возникновения нежелательных эффектов PASS, P _a /P _i			
		Мутагенность	Канцерогенность	Тератогенность	Раздражающее действие
247.NB.0114	1514	-	-	-	0,470/0,025
122.EV.0114	1320	-	-	-	-
018.NB.0114	302.4	0,334/0,04	0,415/0,003	0,230/0,120	-

не удовлетворяющие по токсикологическим свойствам. В итоге, по результатам неспецифического постпроцессинга были выбраны 43 вещества.

Таблица 4
Прогностические результаты
полунгибирующей концентрации на Ха
фактор для некоторых соединений

Объект	IC ₅₀
931.NB.1213	3,04·10 ⁻⁶
105.NB.1213	1,11·10 ⁻⁴
247.NB.1213	2,05·10 ⁻⁶
093.NB.0114	6,50·10 ⁻⁶
177.VY.1213	1,2·10 ⁻⁹
277.VY.1213	5,6·10 ⁻⁸

Ранее было показано, что пороговым значением для отбора соединений на указанных моделях является IC₅₀ больше 1·10⁻⁵. Поэтому по результатам GUSAR-анализа на специфические мишени для дальнейшего молекулярного докинга отобрали 16 соединений.

Для всех исследуемых соединений, при проведении молекулярного докинга, значения оценочной функции (ОФ) было удовлетворительно и приближалось к таковому для соединений сравнения (дабигатрана этексилат) (табл.5). Примеры образования белок-лигандных комплексов отобранных соединений с мишенями представлены на рисунке 2.



Рис. 2. Белок-лигандные комплексы.

Таблица 5
Взаимодействие веществ с
характеристическими аминокислотами
активного центра тромбина

Аминокислоты	Соединение сравнения – дабигатран (О. Ф. = -25 ккал/моль)	247.NB.1213 (О. Ф. = -24 ккал/моль)	178.NB.1213 (О. Ф. = -23 ккал/моль)	152.EK.0713 (О. Ф. = -20 ккал/моль)
His57	+	-	+	-
Trp215	+	-	-	-
Gly216	+	+	+	+
Gly219	+	+	+	+
Glu192	+	+	+	-
Leu99	+	+	-	+
Trp60D	+	+	-	-

По результатам молекулярного докинга отобрали 10 соединений, продемонстрировавших связывание более чем с 50% ключевых аминокислот. Отобранные по результатам *in silico* подхода химические соединения далее были отправлены на скрининг *in vitro*. Два соединения 177.VY.1213 и 277.VY.1213 показали неспецифическую активность в отношении сериновых протеаз каскада свертывания, при этом наиболее выра-

женное влияние наблюдали на энзиматическую функцию XIIa фактора. Тогда как соединения из класса 1,3,4-оксадиазолов оказались неактивны, а одно из веществ, наоборот, проявило индукторное влияние на активность XIIa фактора свертывания (табл. 6).

Таким образом, по результатам комбинированного *in silico/in vitro* подхода было отобрано два соединения (**177.VY.1213** и **277.VY.1213**), перспективных для дальнейшей оптимизации (hit to lead optimization), расширения и идентификации соединений значительно более активных, чем **177.VY.1213** и **277.VY.12**. В отношении 8-ми соединений из класса 1,3,4-оксадиазолов, оказавшихся неактивными в результате *in vitro* скрининга, требуется эксперимен-

тальная проверка их активности *in vivo* с целью исключения ложноотрицательного результата, полученного в результате применения *in silico* метода.

Выводы

Проделанная работа является примером интеграции расчётной теории *in silico*-экспериментов и экспериментов, поставленных на *in vitro*, позволившая идентифицировать биологически активные молекулы по отношению к ферментам из класса сериновых протеаз. С целью уменьшения процента ложноположительных и исключения ложноотрицательных результатов рекомендуется дополнять использованный комбинированный подход данными *in vivo*-экспериментов.

Таблица 6
Значение полуингибирующих концентраций ведущих соединений

Соединение	Фактор VIIa			Фактор IXa			Фактор Xa			Фактор XIa			Фактор XIIa			Калликреин			Тромбин (Фактор IIa)		
	IC50, мкМ	Козф. Хилла	% ингибирования	IC50, мкМ	Козф. Хилла	% ингибирования	IC50, мкМ	Козф. Хилла	% ингибирования	IC50, мкМ	Козф. Хилла	% ингибирования	IC50, мкМ	Козф. Хилла	% ингибирования	IC50, мкМ	Козф. Хилла	% ингибирования	IC50, мкМ	Козф. Хилла	% ингибирования
112.NB.1213	>100	0	-1,4	>100	0	2,1	>100	0	-1,6	>100	0	0,7	>100	0	2,7	>100	0	-2,1	>100	0	1,3
117.VY.1213	>100	0	-0,3	>100	0	-5,5	>100	0	-8,4	>100	0	-2,0	>100	0	-8,5	>100	0	-4,5	>100	0	-0,8
177.VY.1213	>100	1,2	48,6	>100	0	1,4	>100	1,3	34,7	>100	0	21,8	23,8	1,8	92,7	>100	0,6	42,7	>100	0,9	45,5
178.NB.1213	>100	0	-0,3	>100	0	-0,2	>100	0	-4,1	>100	0	-0,5	>100	0	5,4	>100	0	-2,7	>100	0	1,7
191.NB.1213	>100	0	-0,9	>100	0	-2,0	>100	0	-5,3	>100	0	-2,8	>100	0	-3,3	>100	0	-1,6	>100	0	-1,5
193.NB.1213	>100	0	0,0	>100	0	-0,4	>100	0	0,6	>100	0	-2,8	>100	0	5,3	>100	0	-2,1	>100	0	0,1
233.VY.1213	>100	0	-2,2	>100	0	0,9	>100	0	-1,1	>100	0	2,5	>100	0	5,0	>100	0	-1,8	>100	0	1,4
247.NB.1213	>100	0	-1,1	>100	0	-11,1	>100	0	-10,8	>100	0	-6,6	>100	0	-20,5	>100	0	-5,0	>100	0	-4,7
277.VY.1213	>100		25,4	>100	0	-4,2	>100	0	-6,2	>100	0	85,1	85,1	2,4	56,1	>100	0	-1,2	>100		20,8
931.NB.1213	>100	0	-44,6	>100	0	-2,2	>100	0	-3,5	>100	0	-2,1	>100	0	-1,4	>100	0	-0,6	>100	0	0,2

Список литературы

1. **Баскин И.И., Палюлин В.А., Зефи-
ров Н.С.** Молекулярное моделиро-
вание рецепторов физиологически
активных веществ для целей ме-
дицинской химии // Успехи химии.
2009. Т. 78. № 6. С. 539-557.
2. **Хэльтье Х.Д., Зиппль В., Ро-
нъян Д., Фолькерс Г.** Молеку-
лярное моделирование (теория и
практика) / Под редакцией В.А.
Палюлина и Е.В. Радченко.- М.:
БИНОМ. Лаборатория знаний.
2010. 318 с.
3. **Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy,
P.J.** Feeney Experimental and compu-
tational approaches to estimate solubil-
ity and permeability in drug discovery
and development settings /C.A. Lipin-
ski et al.// Advanced Drug Delivery
Reviews.-2001. Vol.46. №1-3. P. 3-26.
4. **Авенирова Е.Л., Алексеева П.А.,
Баранова Н.И., Басс М.С., Буряки-
на А.В., Питухина Н.Н., Федорова
Е.В.** Молекулярные аспекты со-
здания лекарственных препаратов:
использование методов компьютер-
ного моделирования с целью созда-
ния нового противоишемического
средства // Биомедицина. 2014. №1.
С.4-10.
5. **Lagunin A., Zakharov A., Filimonov
D., Poroikov V.** QSAR Modelling of
rat acute toxicity on the basis of PASS
prediction // Mol. Informatics. 2011.
Vol.30, №2-3. P. 241-250.

Development of synthetic anticoagulants - inhibitors of serine proteases: combining *in silico* and *in vitro* approaches

N.I. Baranova, P.A. Alekseeva, K.S. Chistyakov, V.N. Yuskovets,
S.V. Okovityi, A.V. Buryakina, E.V. Fedorova

The aim of this study was to presents a model-based approach based on the integration of computa-
tional theory (*in silico*-experiments) and experiments performed (*in vitro*) to search, optimization and develop-
ment of new anticoagulants molecules with affinity to the family of serine proteases.

The authors gratefully acknowledges to Novartis AG for assistance in the *in vitro* experiments in the
framework of the program “Novartis in-kind collaborations”, as well as the personal gratitude for their
researchers and biologists Ulrich Hassiepen and Gabriela Monnet.

Key words: quantitative structure-activity relationship, molecular docking, serine protease inhibitors, *in
silico* and *in vitro* experiments.

гося в активном центре цистеина. Например, физиологические концентрации перекиси водорода быстро ингибируют *NAT1* [3]. Это ингибирование является обратимым и снимается глутатионом. Также *NAT1* может обратимо ингибироваться нитрозотиолами, в частности S-нитрозо-N-ацетил-DL-пеницилламином и S-нитрозоглутатионом, которые образуют дисульфидные связи с цистеином⁶⁸ [10]. Сильный сульфгидрильный окислитель пероксинитрит быстро и необратимо инактивирует *NAT1* путем необратимой модификации цистеина активного центра [11, 12].

Гены *NAT* обладают полиморфизмом первичной структуры. В настоящее время известно четыре изоформы *NAT*, соответственно, *NAT1*, *NAT2*, *NAT3*, *NAT4*. У изоформ *NAT1* и *NAT2* было обнаружено много аллельных вариантов. Данные об аллельном полиморфизме генов *NAT1* и *NAT2* позволили выделить в человеческой популяции носителей мутаций, обладающих фенотипом медленных и быстрых ацетиляторов.

У медленных ацетиляторов, контактирующих с ароматическими аминами (β -нафтиламин, бензидин), повышен риск заболеваемости раком мочевого пузыря (и вероятно рака молочной железы, печени и легких) [4, 9, 13, 21, 24], что обусловлено накоплением в моче неконъюгированных N-гидроксипроизводных. У быстрых ацетиляторов скорость инактивации и выведения канцерогенных метаболитов существенно выше, но у них чаще регистрируется рак толстого кишечника, вызванный гетероциклическими аминами, образующимися при термической обработке пищи (в основ-

ном мяса) и активирующимися изоферментом *NAT2* [13].

Критическим моментом является изучение системы генов *NAT*, кодирующих целый комплекс ферментов II фазы детоксикации – ацетилирование ароматических и гетероциклических аминов фармакологической или токсической природы (ксенобиотиков, в том числе лекарств – сульфаниламидов, изониазида, кофеина и др.). *NAT1* не обладает широким генетическим полиморфизмом и ацетилюет лишь небольшое количество ариламинов. *NAT2*, в отличие от *NAT1*, генетически полиморфен и является ферментом ацетилирования многих лекарственных средств и ксенобиотиков. Субстратспецифичный профиль и тканевая экспрессия генов *NAT* определяют их функциональную роль как антиоксидантной системы [2, 5, 26].

В Научном центре биомедицинских технологий на протяжении последних 8 лет ведется работа по изучению полиморфизма, в том числе генов *NAT* и связи этого полиморфизма с функцией ацетилирования у мини-свиней и мышей различных инбредных линий [8]. При помощи праймеров, распознающих консервативные участки в генах *NAT*, нами были амплифицированы, и впоследствии клонированы фрагменты геномной ДНК мышей линий DBA2 и BALB/c и мини-свиней светлогорской популяции. Сравнение нуклеотидных последовательностей этих фрагментов с уже известными последовательностями генов *NAT1* и *NAT2* показало, что полученные фрагменты принадлежат генам семейства *NAT* у исследованных животных. При этом в случае мини-свиней полученный ген оказался геном

NAT1, а в случае мышей геном *NAT2*, соответствующие подобным генам человека.

Ацетиляционный полиморфизм связан не только с различными устойчивостями к токсичности лекарств, но и раковыми заболеваниями, связанными с ароматическими и гетероциклическими аминами. N-ацетиляция является катализом двух цитозольных N-ацетилтрансфераз (*NAT1* и *NAT2*), которые обезвреживают многие карциногенные ароматические амины. *NAT1* и *NAT2* также активируют N-гидроксилметаболиты ароматических и гетероциклических аминных карциногенов до составляющих, которые влияют на ДНК и инициируют рак. Классический N-ацетиляционный полиморфизм регулируется локусом *NAT2*, который сегрегирует индивидуумов в быстрые, средние и медленные ацетиляторные фенотипы.

Некоторые эпидемиологические исследования на людях связаны с медленными и быстрыми ацетиляторными фенотипами с повышением чувствительности в мочевом пузыре и колоректальным раком, соответственно. Ацетиляционный полиморфизм был охарактеризован в трех типах грызунов и у мини-свиней для проверки связи между ацетилятором фенотипа *NAT2* и восприимчивостью к ракам, вызванным ароматическими и гетероциклическими аминами в различных целевых органах опухоли. Были клонированы и последовательно представлены *NAT1* и *NAT2* из быстрых и медленных ацетиляторных мышей, сирийского хомяка и крысы. Реконбинанты *NAT1* и *NAT2* энзимов раскодированы, коды этих генов характеризовали их каталитическую активность

по активации (О-ацетиляция) и деактивации (N-ацетиляция) ароматических и гетероциклических аминных карциногенов. Ацетиляторный полиморфизм у мини-свиней, мышей, сирийского хомячка и крысы может быть описан как модель ацетиляционного полиморфизма человека [1].

Несмотря на имеющиеся литературные сообщения [2, 6, 18, 19, 25, 27, 29, 30] до настоящего времени не было предложено ни одной оптимальной биомодели, включая лабораторных животных, которая могла бы быть применима для изучения и описания ацетиляторного полиморфизма человека.

Цель нашего исследования заключалась в сравнительном изучении генов *NAT1* и *NAT2* у людей разных популяционных групп и различных видов лабораторных животных. На первоначальном этапе нами были обозначены следующие задачи:

- провести биоинформационный анализ последовательностей генов *NAT1* и *NAT2* у людей, а также мышей, крыс, кроликов для отбора наиболее перспективных нуклеотидных последовательностей мишеней, для использования в синтезе видоспецифичных праймеров для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР);
- подобрать и исследовать оптимальные конечные концентрации дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, ионов магния (Mg^{2+}) и олигонуклеотидных праймеров, подобрать расчетным и эмпирическим путем оптимальную температуру отжига олигонуклеотидных праймеров, согласно соотношению оснований G/C и A/T их

нуклеотидной последовательности, для полимеразной цепной реакции в реальном времени, оптимизировать количество повторяющихся циклов, при которых происходит наработка продуктов амплификации;

- провести молекулярно-генетические исследования экспрессии генов *NAT1* и *NAT2* на уровне мРНК у людей пяти разных популяционных групп, а также мышей, крыс и кроликов методом ОТ-ПЦР;
- сравнить видоспецифичные праймеры для ОТ-ПЦР у людей и лабораторных животных для последующей оптимизации экстраполяции биомоделей ацетиляционного полиморфизма по *NAT1* и *NAT2*, а также для изучения механизмов сегрегации индивидуумов в медленные, средние или быстрые ацетиляторные фенотипы.

Материалы и методы

Объектом исследования служили мыши линии Balb/c, C57BL/6, CBA/lac, DBA/2, B10.GFP, крысы Wistar, August, WAG, кролики породы «Советская шиншилла». Материалом исследования от животных служила плазма крови. Всего было исследовано 300 мышей, 60 крыс, которых содержали в микроизоляторной системе Rair IsoSystem по 10 голов. Животные соответствовали категории SPF. Кролики содержались в индивидуальных клетках батарейного типа на решетчатых полах. В качестве подстилки для всех видов животных использовали стерильные древесные опилки.

Для мелких лабораторных животных использовали стандартный комбикорм гранулированный полнораци-

онный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась вволю в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях — естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках.

Нами были исследованы образцы крови 27 человек различных популяционных групп. Образцы крови забирались из вены в процессе плановых углубленных медицинских обследований. Поскольку в настоящей работе стояла задача создания и использования высокоспецифичных видовых праймеров к *NAT1* и *NAT2*, этническая и национальная принадлежность пациентов не учитывалась. В процессе углубленного и специального медицинского обследования у пациентов генетических нарушений не установлено.

Этапы эксперимента:

1. Выделение ДНК/РНК из пробы плазмы крови.
2. Амплификация геномной ДНК.
3. Идентификация ПЦР продуктов методом горизонтального электрофореза. Наличие в геле полосы ДНК соответствующего размера свидетельствовало о наличии в образце искомого гена.

Конструирование специфичных праймеров. С этой целью к генам *NAT1* и *NAT2* применяли биоинформационный анализ с помощью комплекса компьютерных программ Vector NTI Advance 9.0 (PC) (<http://www>.