

**Сравнительный анализ эффективности терапии ритуксимабом
к 48-й неделе лечения [14, 15, 17]**

Таблица 5

	Метотрексат (10—25 мг/нед.)			Ритуксимаб (1000 мг.х 2)+Метотрексат		
	Edwards J..	DANCER	REFLEX	Edwards J.	DANCER	REFLEX
ACR20	20%	45%	33%	65%	59%	51%
ACR50	5%	20%	8%	35%	38%	34%
ACR70	0%	8%	4%	15%	17%	14%
DAS28-ремиссия	-	5%	4%	-	10%	12%

в базисной терапии РА, являясь своеобразным «тылом» для наиболее тяжелой категории пациентов, торпидных к лечению не только метотрексатом и/или лефлуномидом, но и ингибиторами TNFa.

Литература

1. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatology Guidelines: Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* - 2002. - Vol. 46. - P. 328-346.
2. Breedveld F.C., Agarwal S., et al. *ACR.* - 2006.
3. Cohen, et al. *ACR.* - 2005 (Abstract 1830).
4. Cooper N.J. Economic burden of rheumatoid arthritis: a systematic review. *// Rheumatology.* - 2000. - Vol. 39. - P. 28—33.
5. Dass S., Rawston A.C. et al. - *ACR 2006.*
6. Dass S., Coulthard. L. et al. - *ACR 2006.*
7. Edwards J.C., Cambridge G. *// Rheumatology (Oxford).* - 2001. - Vol. 40. - P. 205-211.
8. Edwards J.C., Szczepanski L., Szechinski J. et al. *// N. Engl. J. Med.* - 2004. - Vol. 350. - P. 2572-2581.
9. Emery P., Fillipowicz—Sosnowska A., Szczepanski L. et al. *// EULAR.* - 2005; June 8-11, 2005, Viena, Austria, OP008. <http://ard.bmjournals.com/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=jimmunol&resid=175/4/2579>

bmjournals.com/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=jimmunol&resid=175/4/2579

10. Emery P., Szczepanski L., Szechinski J. et al. *//Arthritis Rheum.* - 2003. - Vol. 48 (Suppl). - P. S439.

11. Fleischmann R.M., Emery P., Ellipowicz-Sosnowska A. et al. *// Ann. Rheum. Dis.* - 2005. - Vol. 64 (Suppl III). - P. 434.

12. James R. O'Dell *// N. Engl. J. Med.* - 2004. - Vol. 350. - P. 2591-2602.

13. Jimenez-Boj E., Redlich K., Turk B. et al. *//J. Immunol.* - 2005. - Vol. 175. - P. 2579-2588.

14. Kremer J.M. et al. *ACR.* - 2006.

15. Leandro M.J., Edwards J.C.W., Cambridge G. *// Ann. Rheum. Dis.* - 2000. - Vol. 61. - P. 883-888.

16. Pavelka K., Emery P., Fillipowicz—Sosnowska A. et al. *Efficacy and safety following repeated course of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis. EULAR 2005; June 8— 11, 2005, Viena, Austria, SAT0080.*

17. Pinkus T., Callahan L.F. *// J. Rheumatol.* - 1986. - Vol. 13. - P. 841-845.

18. Reyes-Salinas A., Carrillo-V6zquez S.M., Rodriguez-Falcyn M., Saavedra-Salinas M.A. *// Ann. Rheum. Dis.* - 2005. - Vol. 64 (Suppl III). - P. 472.

19. Scott D.L., Symmons D.P., Coulton B.L., Popert A.J. *// Lancet.* - 1987. № 1. - P. 1108-1111.

20. Silverman G.J., Carson D.A. *//Arthritis Res. Ther.* - 2003, (Suppl 4). - P. S1-S6.

21. Takemura S., Klimiuk P.A., Braun A. et al. *//J. Immunol.* - 2001. - Vol. 167. - P. 4710-4718.

22. Tsokos G.C. *// N. Engl. J. Med.* - 2004. - Vol. 350, - P. 2546-2548.

23. Van Vollenhoven R.F., Emery P. et al. *ACR.* - 2006.

24. Yelin E., Wanke L.A. *//Arthritis Rheum.* - 1999. - Vol. 42. - P. 1209-1218.

Метод анализа экспрессии генов в разработке лекарственных средств из лекарственного растительного сырья

А.И. Иванов, С.А. Коростелев, Л.А. Кумышева

ФГУП «Межбольничная аптека» УД Президента РФ, Московская медицинская академия им И.М. Сеченова

В последние годы известно большое количество разнообразных молекулярных механизмов, реализующих функцию клеток. Оценка влияния веществ на такие молекулярные механизмы позволяет прогнозировать их биологические свойства. В свою очередь такие молекулярные механизмы регулируются активностью тех или иных генов. Поэтому методы молекулярной биологии, расшифровка генов и понимание их функции позволили не только определить механизм развития многих заболеваний, сформировать новые подходы к диагностике, методам их лечения, но и использовать аналогичные методы для оценки эффективности, безопасности и качества лекарственных средств, в том числе и производимых из растительного сырья.

Безусловными предпосылками к возможности такого подхода для оценки лекарственных растительных средств является развитие таких направлений, как геномика, протеомика и биоинформатика, благодаря которым расшифрованы строение отдельных генов, определена структура и функция кодируемых

ими белков и метаболических процессов, связанных с ними. Генетическим профилем клетки определяется ее фенотип, функционирование и ответ на воздействие окружающей среды. Активность генов, экспрессируемых клеткой, очень динамична и быстро отвечает на внешние стимулы. Таким образом, с помощью анализа экспрессии генов возможно не только лучшее понимание молекулярных механизмов функционирования клетки, биохимических процессов и функции, но и оценка их динамики под влиянием внешних факторов, в том числе лекарственных средств.

Теоретической основой анализа генной экспрессии является обнаруженное еще в начале 50-х годов Уотсоном и Криком явление комплементарности нуклеотидных оснований. Это свойство дает возможность определить нуклеотидную последовательность в ДНК на основании гибридизации с известной комплементарной ей пробой. Впервые практическая возможность определения специфических полинуклеотидов из ДНК, разделенных методом гель-электрофореза, была показана

Е.М. Southern в 1975 году [31]. Разработанные впоследствии методики для определения экспрессионных профилей, такие, как вестерн-блоттинг, нозерн-блоттинг, обратная транскриптаза-полимеразная цепная реакция (RT-PCR), твердофазный иммуноферментный анализ, гибридизация *in situ* и иммуногистохимия больше всего подходят для анализа одиночных генов. Несмотря на то, что некоторые из этих методов можно модифицировать для анализа множества генов, процедура в этом случае становится чрезмерно сложной технически. Высокопроизводительным и эффективным методом оценки экспрессии множества генов является использование ДНК-чипов. Технология ДНК-чипов впервые описана в 1995 году М. Schena [27]. Сегодня большинство ДНК-чипов производится синтезом *in situ* фотолитографическим способом либо фиксируется к основанию (стекло, кремний, нейлон) после синтеза и состоит из коротких 20–25 олигонуклеотидов комплементарных последовательностям исследуемых генов [3, 28]. При этом каждому гену соответствует несколько (10–20) таких меченых олигонуклеотидов (зондов). Это существенно повышает точность и воспроизводимость количественного анализа генной экспрессии. Плотность размещения таких олигонуклеотидов, а следовательно, количество генов, анализируемых на одном чипе, могут быть очень велики и охватывать весь геном любого организма, включая человека. На такой чип наносятся меченый (как правило, флуоресцентной меткой) субстрат, представляющий собой обычно к-ДНК или РНК, синтезированную с помощью обратной транскрипции с м-РНК пробы (мишень). В течение определенного времени происходит гибридизация меченой мишени с зондом. Далее излишек пробы удаляется и производится детекция меченых нуклеотидов с помощью специальных устройств, при этом учитываются только те олигонуклеотиды или ДНК-фрагменты, с которыми гибридизировалась меченая ДНК и интенсивность сигнала, отражающая количество меченых молекул в данной ячейке чипа.

ДНК-чипы представляют собой подходящую высокопроизводительную платформу для исследования и разработки лекарственных растительных средств. Безусловно, действие таких лекарственных средств опосредуется химическими соединениями, качественный и количественный состав которых опосредуется генетическим профилем растения. Поэтому оценка генетического профиля лекарственного растения может служить хорошим методом оценки лекарственного растительного сырья. Применение его в фармакогнозии возможно для правильной идентификации растительного сырья, его стандартизации и контроля качества.

Фармакогнозия в основном идентифицирует и оценивает качество растительного сырья с помощью рутинных ботанических, морфологических и органолептических параметров лекарственного сырья, которые не всегда полноценно отражают его характеристики. Конечно, применение спектрометрических, ЯМР, ВЭЖХ, ГЖХ и т.п. методов является хорошим способом оценки химического профиля и, как следствие, качества растительного сырья. В то же время химические методы при анализе растительного сырья в некоторых случаях имеют ограничения, связанные с большим количеством биологически активных соединений, так как часто только комбинация свойств каждого из них вызывает необходимый терапевтический эффект. Поэтому, помимо количественных значений того или иного химического соединения, входящего в состав растительного сырья, важное значение имеет и их относительное содержание. Фармакогнозия включает использование генотипически опосредованных молекулярных методов, позволяющих получить наиболее полные характеристики растительного сырья. ДНК-маркеры обладают рядом преимуществ по сравнению с обычными фенотипическими маркерами. ДНК-маркеры являются наиболее достоверными, так как генетическая структура является уникальной для каждого вида и не зависит от возраста,

состояния и от факторов окружающей среды [6]. ДНК может быть выделена из сырого, высушенного или обработанного растительного материала [39]. Наличие в образце растения определенных нуклеотидных последовательностей может служить наиболее специфичным критерием присутствия в нем определенных генов. В качестве уникального метода, используемого для этих целей, может быть анализ экспрессии генов, набор которых уникален для каждого вида лекарственных растений, и сравнение их с видоспецифичными зондами. Такие зонды способны улавливать комплементарные мишени ДНК-последовательностей, если они присутствуют в анализируемом образце.

Техническая возможность такого подхода была продемонстрирована для дифференциации нескольких видов Рябчика императорского (*Fritillaria*). Результаты этого исследования показали, что используемая технология является быстрым и высокопроизводительным способом определения видов растений [33]. В отношении лекарственных растений такой подход был использован для определения нескольких видов растений рода *Dendrobium*, которых в Китае произрастает более 60 разновидностей. Однако не все они применяются в качестве лекарственного сырья, что делает важной проблему идентификации необходимых видов. С помощью метода анализа генной экспрессии пять близкородственных видов *Dendrobium* (*D. aurantiacum* Kerr, *D. officinale* Kimura и Migo, *D. nobile* Lindl., *D. chrysotoxum* Lindl. и *D. fimbriatum* Hook) были идентифицированы достаточно точно [18]. Кремниевый ДНК-чип, содержащий видоспецифичные олигонуклеотидные зонды, был использован для идентификации ряда токсичных видов (*Aconitum carmichaeli*, *A. kusnezoffi*, *Alocasia macrorrhiza*, *Croton tiglium*, *Datura innoxia*, *D. metel*, *D. tatula*, *Dysosma pleiantha*, *Dy. versipellis*, *Euphorbia kansui*, *Hyoscyamus niger*, *Pinellia cordata*, *P. pedatisecta*, *P. ternata*, *Rhododendron molle*, *Strychnos nux-vomica*, *Typhonium divaricatum* и *T. giganteum*) растений, применяемых в традиционной китайской медицине [5]. Эти и другие исследования показали, что определение видов медицинских растений с помощью ДНК-чипа является экономичным и точным средством контроля качества и мониторинга безопасности лекарственных средств и нутрицевтиков из растительного сырья. Существенным преимуществом такой подход обладает при идентификации высушенного или обработанного сырья, когда его морфологическая оценка не может быть достаточно достоверна. С другой стороны, он может быть использован для дифференциации морфологически сходных лекарственных растений, которые могут значительно отличаться по своим биологическим свойствам. Важным достоинством описываемого метода является возможность быстрого тестирования множества образцов, в то время как использование традиционных (основанных на анализе химических компонентов) методов тестирования является трудоемким процессом, а тестирование на основе морфологических характеристик недостаточно точным методом.

К сожалению, клинический опыт и огромная практика использования растительных лекарственных средств многими поколениями не являются абсолютной гарантией их эффективности и безопасности. Остается много вопросов, касающихся эффективности, безопасности, фармакокинетики и механизма действия лекарственных средств, получаемых даже из наиболее широко используемых лекарственных растений. В лекарственных растительных препаратах большое количество химических веществ совместно действует на множество мишеней. Подход с использованием ДНК-чипа может быть легким и высокопроизводительным методом получения необходимой доказательной базы биологического действия новых и известных лекарственных средств из растительного сырья. Анализ изменения экспрессии генов в клетках (на животных моделях или *in vitro*) под влиянием биологически активных веществ может служить инструментом

оценки их эффективности, безопасности, прогнозирования потенциальных побочных эффектов и может быть использован как для скрининга, так и для определения молекулярных мишеней и изучения механизма их действия.

Наиболее достоверные данные изменения экспрессии генов получены при изучении влияния лекарственных растительных средств и отдельных химических веществ растительного происхождения в отношении онкологической патологии. Вероятно, это связано с тем, что генетическая регуляция опухолевого процесса изучена достаточно хорошо, в нем определена роль конкретных генов и создано достаточное количество ДНК-чипов, которые можно использовать для оценки их экспрессии и ее динамики под влиянием растительных препаратов. Так, с помощью ДНК-чипа, содержащего 12600 олигонуклеотидных последовательностей, была изучена антипролиферативная активность корней Коптиса (*Coptidis rhizome*) в отношении восьми клеточных линий рака поджелудочной железы человека. Среди множества нуклеотидных последовательностей были отобраны 13 и 20 генов с сильными корреляциями ($> 0,81$) с антипролиферативной активностью для *C. Rhizome* и его основного активного компонента берберина соответственно. Среди этих 33 генов уровни экспрессии 12 генов совпадали у обоих изучаемых объектов. Вероятно, именно эти гены связаны с противоопухолевой активностью берберина. Таким образом, были идентифицированы общие и отличные гены, ответственные за антипролиферативное действие *Coptidis rhizoma* и очищенного берберина. Вероятно, выбранная стратегия позволит лучше понять механизм противоопухолевой активности и других растительных лекарственных средств [14]. Другое исследование лекарственного средства, содержащего этот же растительный компонент, проведено с использованием технологии анализа экспрессии генов в двух линиях ячейки рака молочной железы человека — эстрогензависимых MCF7 и эстроген-независимых MDA-MB-231. Инкубация этих клеток с экстрактом *Coptidis rhizoma* вызывало дозо- и время-зависимый антипролиферативный эффект. Этот эффект был более выраженным в отношении клеток MCF7. Исследование также показало большое увеличение м-РНК, кодирующие молекулы IFN- β и TNF- α в этих клетках. Введение в культуру клеток антител против IFN- β заметно блокировало антипролиферативный эффект экстракта изучаемого растения, что доказывает участие в его механизме действия бета-интерферона. Учитывая, что бета-интерферон является одним из самых важных эндогенных белков, участвующих в противоопухолевой защите, увеличение экспрессии этого гена, по крайней мере частично, объясняет его противоопухолевый эффект. Результаты этого исследования также показывают эффективность использования метода анализа экспрессии в изучении механизма действия лекарственных растений [15]. Обнаружено, что механизм действия алкалоидов некоторых растений семейства бересклетовых (*Celastraceae*), применяемых в китайской народной медицине, опосредуется через гены семейства *c-myc*, которые участвуют в процессах пролиферации, дифференцировки и канцерогенеза, а также ген, кодирующий сигнальный белок NF- κ B, который является регулятором экспрессии многих генов, вовлеченных в процессы апоптоза и деления клеток [43]. В другом исследовании анализ с ДНК-чипом показал, что транскрипция генов, связанных с апоптозом, модифицируется в клетках PC12, под влиянием экстракта Гинкго билоба (*Ginkgo biloba*), что, вероятно, и опосредует механизм его цитостатического действия [19, 29]. Кроме того, этим же методом показано, что в подвергнутых воздействию экстракта Гинкго билоба опухолевых клетках молочной железы человека изменялась экспрессия генов, которые участвуют в регуляции клеточной пролиферации, клеточной дифференцировки или апоптоза [10]. С помощью анализа генной экспрессии и RT-PCR-анализа были найдены лекарственные мишени действия водного экстракта

корня пиона. Так, водный экстракт корня пиона оказывает подавляющее воздействие на рост опухолевых клеток HerG2 и Her3B [17]. В нескольких аналогичных исследованиях показано, что 16 генов, участвующих в деструкции ДНК, контроле клеточного цикла, связывании нуклеиновых кислот и фосфорилировании белков, изменились более чем в 5 раз под влиянием экстракта из растения *Scutellaria barbata* (*S. barbata*), произрастающего в южном Китае, широко используемого как противовоспалительное и мочегонное средство. Кроме того, некоторые исследования свидетельствуют, что экстракты *S. barbata* обладают ингибирующим влиянием на некоторые формы рака (печени, молочной железы, хорионэпителиома, опухоли пищеварительной системы). Однако механизм, лежащий в основе такой противоопухолевой активности, был неясен. Для его изучения использовали линию легочных опухолевых клеток A549. Результаты показали, что спиртовой экстракт *S. barbata* обладал выраженным цитотоксическим эффектом, реализуемым через апоптоз. Анализ показал, что экспрессия 16 генов, вовлеченных в повреждение ДНК, контроль клеточного цикла, связывание нуклеиновых кислот и фосфорилирование белка, изменялась более чем в 5 раз. Кроме того, было обнаружено его ингибирующее влияние на клетки, несущие рецепторы CD209 (родственные дендритным клеткам). Вероятно, именно эти механизмы лежат в основе противоопухолевого эффекта *S. barbata*. [41]. С помощью ДНК-чипа, содержащего 24 гена, связанных с клеточным циклом, было изучено антипролиферативное действие четырех лекарственных растений (*Radix Linderae*, *Hebra Artemisiae Annuae*, *Radix Ameliae*, *Radix Astragali*) на опухолевые клетки SMMC-7721. Полученные данные показали очевидное влияние изученных лекарственных растений на ключевые гены, регулирующие клеточный цикл [35]. Клинические испытания лекарственного растительного средства PC-SPES показали выраженный эффект у пациентов с поздними стадиями рака простаты. Лабораторные исследования и клиническое наблюдение позволяют предположить, что эффекты PC-SPES, по крайней мере частично, реализуются через его эстрогенную активность, хотя окончательно механизмы его действия оставались в значительной степени неясными. Использование анализа генетической экспрессии позволили определить, что PC-SPES изменил экспрессию 156 генов в клетках карциномы простаты LNCaP. Особенно показательно, что под его влиянием была снижена экспрессия генов, кодирующих альфа-бета- и тубулины и рецепторы андрогена. Таким образом, сравнение экспрессии генов до и после лечения показало ассоциацию активности PC-SPES с изменением экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла и клеточной структуры, а также их ответа на андрогены [4].

Ряд исследований показал эффективность применения метода анализа экспрессии генов с целью изучения механизма действия лекарственных растительных средств при сердечно-сосудистых заболеваниях. В экспериментальных моделях постинфарктной сердечной недостаточности (крысы) с использованием ДНК-чипа, содержащего 4096 генов, показано, что таковая коррелирует с изменением экспрессии большого количества генов, вовлеченных в энергетический метаболизм, связанных с пролиферацией кардиомиоцитов. Введение в рацион животных растительной пищевой добавки Q1 в течение 4 недель не только существенно улучшает сердечную функцию, но и модифицирует экспрессию указанных генов [42]. Изучение молекулярного механизма действия лигустриана, основного действующего компонента Любистока сычуаньского (*Ligusticum Chuanxiong*), также проводилось в отношении генов, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В культуре человеческих эндотелиальных клеток, полученных из пуповинной вены после 4-часовой обработки лигустрианом, увеличивалась экспрессия генов, регулирующих связывание кальция АТФазой, работу натриевых каналов и гена P450c11, кодирующего бета-гидроксилазу. В то же время снижалась

экспрессия гена аполипопротеина С-II. Эти результаты были подтверждены методом RT-PCR [20]. Использование ДНК-чипов, содержащих зонды, соответствующие генам, связанным с сердечно-сосудистыми заболеваниями, показало, что молекулярные механизмы действия сапонинов из корневища Анемаррены асфоделивидной (*Anemarrhena asphodeloides*) опосредуются влиянием на функции эндотелиальных клеток вен [21]. Другое аналогичное исследование продемонстрировало значительное подавление индуцируемой эндотелиальной экспрессии нового кардиорегуляторного гена с помощью экстракта виноградных косточек [2].

Показана возможность использования ДНК-чип-технологии в оценке механизма биологического действия лекарственных растительных средств и при ряде других заболеваний. Так, при использовании ДНК-чипа, содержащего зонды комплементарные крысиному геному, показано, что регулирующие влияние флавоноидов из Горянки крупночашечковой (*Epimedium macrosepalum*) на иммунную систему старых крыс связано с восстановлением нарушенного равновесия генной экспрессии в лимфоидных клетках [7]. Технология анализа генной экспрессии была использована при изучении механизма действия комплексного лекарственного средства из растительного сырья VI-28, применяемого в традиционной китайской медицине для лечения больных СПИДом и гепатитом В. Показано, что под влиянием этого средства в лимфоидных клетках человека существенно увеличивается экспрессия генов IL-1, IL-1, IFN- γ и других белков, регулирующих иммунологическую функцию [24]. С помощью анализа экспрессии генов был изучен механизм действия хорошо известного иммуностимулирующего растения Эхинацея. Исследование показало, что экстракт корней или надземных частей этого растения изменяет экспрессию CD83 маркера на дендритных клетках человека, известных как специализированные антигенпрезентирующие клетки, запускающие механизм Т-клеточного иммунного ответа. Кроме того, под влиянием экстракта *E. purpurea* снижалась экспрессия генов, отвечающих за продукцию хемокинов (например, CCL3 и CCL8) и их рецепторов (например, CCR1 и CCR9). Экспрессия других генов, кодирующих белки CCL4 и CCL2, наоборот повышалась. Это исследование свидетельствует, что экстракты *E. purpurea* могут изменять дифференцировку дендритных клеток и экспрессию специфических иммунорегуляторных генов в них [34]. Целью другого исследования было доказать, что стимуляция регенерационных процессов в печени под влиянием лекарственного средства, содержащего Шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* Georgi), коррелирует с экспрессией генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, а также "ранних генов", кодирующих ядерные белки, которые являются транскрипционными факторами и регулируют экспрессию других генов (*c-fos* и *c-tus*). Оказалось, что введение различных доз изучаемого лекарственного средства мышам BALB/c с 70% гепатектомией вызывает дозозависимые изменения экспрессии указанных генов. Эти эффекты коррелируют с сывороточным уровнем ИЛ-6 и пролиферативной активностью клеток печени [36]. Использование ДНК-чипа, содержащего 18816 генов, позволило выявить, что экспрессия 33 генов модифицируется при лечении растительными лекарственными средствами почечной недостаточности, что коррелирует с клиническим эффектом и может быть индикатором эффективности применяемого лечения [23]. На экспериментальных моделях был показан механизм действия растительных гликозидов при восстановлении пространственной памяти мышей, страдающих от мозговой ишемии. Под их влиянием было отмечено существенное увеличение экспрессии генов, регулирующих клеточный цикл, сигнальную трансдукцию и др. Чтобы показать механизм восстановления пространственной памяти мышей, страдающих от мозговой ишемии под влиянием растительных гликозидов, был использован ДНК-чип, содержащий 1176 известных генов. Показано, что патологический процесс

в ишемизированном мозге мышей связан с изменением экспрессии около 100 генов, включая гены, регулирующие клеточный цикл и принимающие участие в трансдукции сигналов и факторов транскрипции в нервных клетках. Дозозависимый эффект от введения гликозидов показал, что сокращение объема некротизированной зоны связано, примерно, с двукратным изменением экспрессии этих генов [37]. Эффективность использования ДНК-чипов установлена при изучении механизма противовоспалительного действия стандартизованного экстракта Босвеллии (*Boswellia Serrata*) [26], нейропротективного действия экстракта из листьев *Ginkgo biloba* [40], метаболической активности тритерпеновых компонентов, полученных из тропического растения Сентелла азиатская (*Centella asiatica*) [8].

Кроме изучения механизма фармакологического действия лекарственных средств, оценка генетического профиля может быть полезной для определения индивидуальной, расовой и популяционной чувствительности к действию лекарственного средства, а также преодолению лекарственной резистентности или индивидуальной непереносимости на отдельные лекарственные средства, выявления генов, отвечающих за чувствительность или устойчивость к препарату, и выделения пациентов, применение лекарственного средства у которых будет наиболее эффективно (фармакогеномика). Это особенно важно при использовании многокомпонентных лекарственных средств, получаемых в том числе и из лекарственного растительного сырья. Так, ДНК-чипы могут быть использованы для прогнозирования эффективности препарата у отдельных пациентов и полезны для индивидуального подбора его дозы и длительности использования. В отношении лекарственных растительных средств такое исследование было сделано с использованием зондов, ассоциированных с генами, кодирующими белки, которые регулируют артериальное давление. Такой подход оказался достаточно эффективным при оценке индивидуального ответа на растительные антигипертензивные препараты. Так, использование панели, содержащей 74 нуклеотидные последовательности, кодирующие 25 генов, вовлеченных в регуляцию артериального давления, показало возможность прогнозирования реакции пациентов на прием лекарственных средств [22].

В токсикологических исследованиях оценка экспрессии генов и сопоставление ее с известными данными может быть инструментом скрининга токсичных свойств новых химических соединений, предлагаемых в качестве лекарственных средств [1, 38]. Изменение экспрессии генов, например, регулирующих процессы апоптоза, связанных с ответом на повреждение ДНК или стрессорные реакции, принимающих участие в процессах детоксикации или некоторых генов, обеспечивающих процессы гликолиза, биосинтеза аминокислот и нуклеотидов, катаболизм белков — т.н. «housekeeping genes» (бета-актин, GAD6, циклофиллин А и т.п.) под влиянием изучаемого вещества, как правило, коррелирует с его системной токсичностью. Это подтверждается несколькими исследованиями с ДНК-чипом, содержащим нуклеотидные последовательности, комплементарные более чем 12000 человеческим генам, ассоциированным с проявлением токсического действия к большому числу токсинов [25]. Известно, что прием лекарственных растительных средств может маскировать, усиливать или ослаблять эффект других лекарственных средств, используемых в комбинации. Механизм и результат такого взаимодействия вполне может быть предсказан при помощи ДНК-чипа [10, 11].

Заключение

Традиционно исследование лекарственного средства было сосредоточено на оценке его действия на один или несколько клеточных субстратов. В то же время в патогенезе любого заболевания могут быть задействованы десятки белков. Поэтому при создании новых лекарственных средств следует

выбирать такие химические соединения или их комбинации, которые блокируют максимально возможное количество патологических изменений на клеточном или системном уровне. Во многих случаях такие удачные комбинации созданы природой в виде лекарственных растений. Однако они могут содержать очень большое количество химических веществ, которые не всегда действуют синергично. В силу поликомпонентности лекарственных растительных средств оценка их свойств традиционными методами достаточно сложна и не всегда объективна. Современным подходом решения этих проблем является анализ экспрессии генов с помощью ДНК-чипа. Это стало возможным благодаря изучению структуры геновой экспрессии и ее динамики на различных стадиях развития заболевания. Таким образом, формирование базы данных биомаркеров нормального и патологического состояния человека помогает не только в оценке развития заболевания, его прогнозе, но и дает возможность оценить эффективность применения лекарственного вещества или комбинации таковых.

С другой стороны, анализ экспрессии генов может быть полезен для формирования необходимой биологической активности лекарственного средства из растительного сырья путем экстракции некоторых соединений или, наоборот, добавлением в композицию других компонентов, обладающих однонаправленным эффектом, но, возможно, опосредованными другими биохимическими механизмами. Представленные данные показывают, что анализ экспрессии генов может быть использован для создания оптимальной композиции лекарственных растений, обеспечивающей ее адекватную фармакодинамику. Этот подход может быть полезен и для идентификации активных компонентов, дальнейшее выделение или синтез которых может быть путем создания новых лекарственных средств.

В области фармакогеномики с помощью ДНК-чипов возможен индивидуальный подбор максимально эффективных лекарственных средств или выделения групповых признаков, определяющих подбор оптимального препарата.

Скрининг экспрессии генов, отвечающих за токсические эффекты, может быть эффективен для прогнозирования побочных эффектов, связанных с наличием в лекарственном растительном средстве некоторых компонентов, определение и элиминация которых из состава препарата, может снизить проявление его токсических свойств.

Анализ экспрессии видоспецифичных генов с помощью ДНК-чипа может быть важным инструментом идентификации растительного сырья, применяемого для производства лекарственных средств. Особенно информативным этот метод является при дифференциации близкородственных или морфологически сходных видов. Он также может быть полезен для идентификации высушенного или частично обработанного сырья, когда морфологическая идентификация его невозможна. Преимуществом описываемой технологии является не только точность результатов, но также ее скорость и невысокая стоимость по сравнению с традиционными аналитическими методами. Следует отметить, что подтверждение качества лекарственных растительных средств и нутрицевтиков с помощью анализа геновой экспрессии позволит значительно увеличить их качество и, соответственно, коммерческую выгоду для производителей. С другой стороны, стандартизация и официальное признание этого метода национальными регуляторными организациями будет важным инструментом борьбы с некачественной и фальсифицированной продукцией.

Таким образом, ДНК-чипы являются новой и эффективной стратегией для полной оценки экспрессии генов, которая может быть полезна при создании новых лекарственных средств из растительного сырья. Однако ряд проблем в некоторых случаях может ограничивать использование ДНК-чипов для этих целей. Прежде всего, это отсутствие полных баз

данных об экспрессии специфичных генов в изучаемых видах лекарственного растительного сырья. Формирование банков генов лекарственных растений, произрастающих в различных регионах, и формализация полученных данных, безусловно, являются необходимой задачей, без которой невозможна оценка результатов, получаемых в отдельных экспериментах. Важным шагом в этом направлении является международный проект Consortium for the Barcode of Life (CBOL), содержательной частью которого является формирование базы данных, содержащих генетические штрих-коды (видоспецифичную последовательность ДНК) животных и лекарственных растений. Другой стороной этой же задачи является создание ДНК-чипов со специфичными для исследуемых видов олигонуклеотидами. Оценка фармакодинамики лекарственных растительных средств с помощью ДНК-чипов ограничивается наличием доказанных маркеров патологии на уровне экспрессии генов. Поэтому большую роль в разработке ДНК-чипов играют биоинформатика и статистические данные. Так, только результаты многих экспериментов могут быть доказательной базой связи экспрессии того или иного гена с определенным заболеванием или патологическим состоянием.

Другие проблемы использования ДНК-чипов связаны с их чувствительностью, а также точностью, специфичностью и воспроизводимостью результатов, получаемых с их применением. Хотя чувствительность этого метода достаточно высока, она может колебаться от одной до десятков копий м-РНК на клетку, что в некоторых случаях может иметь существенное значение. Несмотря на то, что абсолютная оценка уровня транскрипции с использованием описываемого метода невозможна, текущие возможности позволяют достаточно точно оценить уровень экспрессии генов, когда он существенно превышает чувствительность метода. Недостаточная специфичность метода может зависеть от низкой специфичности к-ДНК зондов, а иногда встречающиеся проблемы с воспроизводимостью данных в основном связаны с использованием различных технологических платформ [30]. Поэтому, несмотря на то, что микрочипы ДНК обладают огромным потенциалом для применения в фармакогнозии, фармакодинамике и фармако- и токсикогеномике, они все еще находятся на стадии исследования и нуждаются в верификации другими стандартными методами.

Другой фактор, лимитирующий применение микрочипов, — это стоимость технологии. Стоимость таких чипов может быть небольшой только при их массовом производстве. Одним из технологических процессов изготовления ДНК-чипов является применение разработанных для нужд микроэлектроники литографических технологий с использованием ультрафиолетового излучения. Такая технология позволяет синтезировать олигонуклеотиды непосредственно на поверхности чипа. Недостатком этой технологии является необходимость литографических масок, что ограничивает возможность синтеза этих чипов рамками крупных фирм. Последним достижением в данной области стала разработка технологии, позволяющей обойтись без литографических масок. Это делает синтез чипов с плотностью олигонуклеотидов любой заданной последовательности, превышающей 1 000 000 на 1 см², доступным любой лаборатории.

Таким образом, при решении вопроса создания стандартизированных, чувствительных и воспроизводимых платформ ДНК-чипов, баз данных и методов регистрации оцениваемых экспрессионных профилей, микрочипы ДНК можно будет использовать в исследовании лекарственных растительных средств как стандартную методику. В то же время, несмотря на огромный потенциал технологии микрочипов, важность биологических исследований в культурах клеток и экспериментов *in vivo* остается по-прежнему большой. Поэтому стратегия создания новых лекарственных средств с использованием растительного сырья должна интегрировать как традиционные, так и современные, основанные на

молекулярных технологиях методы для получения необходимых доказательств эффективности, безопасности и качества лекарственных средств из растительного сырья.

Литература

1. Amin R.P., Hamadeh H.K., Bushel P.R. et al. // *Toxicology*. - 2002. - P. 181, 555-563.
2. Barret J.C., Kawasaki E.S. // *Drug. Discov. Today*. - 2003. - №8. - P. 134-141.
3. Bagchi D., Sen C.K., Ray S.D., Das D.K., Bagchi M., Preuss H.G. et al. // *Mutat Res.* - 2003. - P. 523-524, 87-97.
4. Bonham M., Arnold H., Montgomery B., Nelson P.S. // *Cancer Res.* - 2002. - Vol. 62. - P. 3920-3924.
5. Carles M., Cheung M.K., Moganti S. et al. // *Planta Med.* - 2005. - Vol. 71. - P. 580-584.
6. Chan K. // *Chemosphere*. - 2003. - Vol. 52. - P. 1361-1371.
7. Chen Y., Shen Z. Y., Chen W.H. // *Zhongguo ZhongXi YiJie He Za Zhi*. - 2004. - Vol. 24. - P. 59-62 [Chinese].
8. Coldren C.D., Hashim P., Ali J.M. et al. // *Planta Med.* 2003. - Vol. 69. - P. 725-732.
9. Coxeter P.D., McLachlan A.J., Duke C.C., Roufogalis B.D. // *Curr Med Chem*. - 2004. - № 11. - P. 1513-1525.
10. De Feudis F. V., Papadopoulos V., Drieu K. // *Fundam Clin Pharmacol*. - 2003. - №17. - P. 405-417.
11. Fugh-Berman A. // *Lancet*. - 2000. - P. 355, 134-138.
12. Hacia J.G., Collins F.S. // *J/ Med. Genet.* - 1999. - Vol. 36. - P. 730-736.
13. Hara A., Iizuka N., Hamamoto Y. Et al. // *Life Sci.* - 2005. - № 15-77(9). - P. 991-1002.
14. Iizuka N., Oka M., Yamamoto K. et al. // *Int. J. Cancer*. 2003. - Vol. 107. - P. 666-672.
15. Kang J.X., Liu J., Wang J. et al. // *Carcinogenesis*. - 2005. - Vol. 26, № 11. - P. 1934-1939.
16. Ko S.Y., Lin S.C., Chang K.W. et al. // *J. Oral. Pathol. Med.* - 2003. - Vol. 32. - P. 399-407.
17. Lee S.M., Li M.L., et al. // *Life Sci.* - 2002. - Vol. 71. - P. 267-2277.
18. Li T., Wang J., Lu Z. Chien-Shiung Wu. // *J. Biochem. Biophys. Methods*. - 2005. - Vol. 28; 62, № 2. - P. 111-123.
19. Li W., Pretner E., et al. // *Cell. Mol. Biol.* - Vol. 48. - P. 55-662.
20. Li Z., Li D., Huang J. Et al. // *Pol. J. Pharmacol.* - 2004. - Vol. 56, № 4. - P. 427-433.
21. Li Z.S., Li D.L., Huang et al. // *Yao Xue Bao*. - Vol. 38. - P. 496-500 [Chinese].
22. Liljedahl U., Karlsson J., Melhus et al. // *Pharmacogenetics*. - 2003. - № 13. - P. 7-17.
23. Pan L., Wang M., Wang J.G. et al. // *Am. J. Chin. Med.* - 2006. - Vol. 34, № 3. - P. 387-400.
24. Pan-Hammarstrom Q., Wen S., Hammarstrom L. // *J. Interferon. Cytokine Res.* - 2006. - Vol. 26, № 9. - P. 628-636.
25. Pennie W.D. // *Toxicology*. - 2002. - P. 181-182; 551-554.
26. Roy S., Khanna S., Shah H. et al. // *DNA Cell Biol.* - 2005. - Vol. 24. - P. 244-255.
27. Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. // *Science*. - 1995. - P. 270, 467-470.
28. Sinibaldi R. // *Drug. Discov. World*. - 2003. - № 5. - P. 37-43.
29. Smith J.Y., Burdick A.J., Golik P. et al. // *Cell. Mol. Biol.* - 2002. - Vol. 48. - P. 699-707.
30. Sorin Draghici, Purvesh Khatri, Aron C. // *Eklund, Zoltan Szallasi Reliability and reproducibility issues DNA microarray measurements Trends in Genetics*. - 2006. - № 22 (2). - P. 101-109.
31. Southern E.M., // *J. Mol. Biol.* - 1975. - Vol. 98, № 3. - P. 503-517
32. Tsai W.C., Tsai S. T., Ko J. Y. et al. // *Oral Oncol.* - 2004. - Vol. 40. - P. 418-426.
33. Tsoi P. Y., Wu H.S., Wong M.S. et al. // *Acta Pharm Sin.* - 2003. - №4. - P. 185 - 190.
34. Wang C.Y., Chiao M.T., Yen P.J. et al. // *Genomics*. - 2006. - Vol. 88, N9 6. - P. 801-808.
35. Wang G.L., Chen C.B., Gao J.M. et al. // *Molecular Cytogenetics Lab, Nankai University, Tianjin 300071, China*.
36. Wang J. Y., Chiu J.H., Tsai T.H. et al. // *Int. J. Mol. Med.* - 2005. - Vol. 16, № 2. - P. 221-231.
37. Wang Z., Du Q., Wang F. et al. // *J. Neurochem.* - 2004. - Vol. 88. - P. 1406-1415.
38. Waring J/F/ Gum R, Morfitt D. et al. // *Toxicology*. - 2002. - Vol. 181. - P. 537-550.
39. Warude D., Chavan P., Kalpana J., Patwardhan B., Plant Mol. // *Biol. Rep.* - 2003. - Vol. 21. - P. 1.
40. Watanabe C.M., Wolffram S., Ader P. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. - 2001. - №9. - P. 6577-6580.
41. Yin X, Zhou J., Jie C. Et al. // *Life Sci.* - 2004. - Vol. 75. - P. 2233-2244.
42. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. - 2005. - Vol. 25, № 1. - P. 45-48.
43. Zhuang W.J., Fong C.C., Cao J. et al. // *Hutch Phytomedicine*. - 2004. - № 11. - P. 295-302.