

полученными из банка генетической информации Национального центра биотехнологической информации США (NCBI).

Для оценки количества нарабатываемого белка из нерастворимых включений была повторена схема солюбилизации, описанная в работе китайских коллег [10]. В данной публикации сообщалось, что отмывка белковых включений в присутствии 2 %-го дезоксихолата натрия и солюбилизация в 10 мМ Трис-Cl, 0.1 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 мМ мочеvine и 5 мМ дитиотреитолу (рН 8,0) приводила к солюбилизации рекомбинантного белка. Соблюдение описанной процедуры позволило получить до 15 мг солюбилизованного в мочеvine белка из 1 литра бактериальной культуры.

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ № 12-08-01086-а).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Adv. Exp. Med. Biol. — 2007. — Vol. 608. — P. 119–129.
2. Anal. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
3. Anticancer Res. — 2004. — Vol. 24. — P. 1261–1266.
4. Cancer Immunol. Immunother. — 2006. — Vol. 55 (9). — P. 1091–1099.
5. Clin. Cancer Res. — 2002. — Vol. 8. — P. 520–525.
6. Int. J. Gynaecol. Obstet. — 2008. — Vol. 102 (2). — P. 128–131.
7. J. Mol. Biol. — 1996. — Vol. 260. — P. 289–298.
8. Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.
9. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76 (2). — P. 615–619.
10. Protein Expr. Purif. — 2006. — Vol. 53 (2). — P. 247–254.
11. Science. — 1985. — Vol. 230. — P. 1132–1139.

## РЕЗЮМЕ

*В. В. Долгих, И. В. Сендерский, Г. В. Тец, В. В. Тец*

### Гетерологичная экспрессия экстраклеточного домена рецептора HER2 в бактериях

Рецептор эпидермального ростового фактора человека (HER2/neu, c-ErbB2) представляет собой протоонкогенный белок и экспрессируется при ряде онкологических заболеваний, включающих 30 % случаев рака молочной железы, а также опухоли яичника, желудка и других органов. Получение значительных количеств экстраклеточного домена ECD HER2 в очищенном виде остается весьма актуальной задачей для иммунодиагностики и терапии. Клонирована последовательность, кодирующая экстраклеточный домен рецептора HER2 человека, и осуществлена эффективная наработка рекомбинантного белка в бактериях *E. coli*.

**Ключевые слова:** рецептор эпидермального фактора роста, экстраклеточный домен, бактериальная экспрессия.

## SUMMARY

*V. V. Dolgikh, I. V. Senderskiy, G. V. Tetz, V. V. Tetz*

### Extracellular domain of HER2 heterologous expression in bacteria

Human epidermal growth factor receptor (HER2/neu, c-ErbB2) is a proto-oncogene protein which is overexpressed in some oncological diseases including 30 % of breast cancers, tumors in the ovary, stomach and other organs of the human body as well. Since Her2-tumor status testing is the essential part of successful cancer treatment, expression and purification of substantial amounts of the extracellular domain of the ECD HER2 is an important task. In this work sequence encoding HER2 extracellular domain was cloned and expressed in *E. coli*.

**Key words:** epidermal growth factor receptor, extracellular domain, bacterial expression, refolding.

© Коллектив авторов, 2013 г.  
УДК [616.831-006.484:616.831.31-009.24]-097.3

**В. Н. Очколяс, А. Ф. Гурчин,  
А. А. Скоромец, А. В. Костюкевич**

## ЭПИЛЕПТИЧЕСКИЙ СИНДРОМ В КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И УРОВЕНЬ АУТОАНТИТЕЛ К GluR1-СУБЪ- ЕДИНИЦЕ АМРА-РЕЦЕПТОРОВ ГЛЮТАМАТА У БОЛЬНЫХ ГЛИО- МАМИ ПОЛУШАРИЙ БОЛЬ- ШОГО МОЗГА

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова; Институт мозга человека имени Н. П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург

Несмотря на значительные успехи в изучении эпилептогенеза за последнее десятилетие, теоретический и практический интерес к изучению клеточно-молекулярных механизмов развития симптоматической эпилепсии не ослабевает. Большую роль в клеточно-молекулярных механизмах эпилептогенеза играют АМРА ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) ионотропные глутаматные рецепторы. Через рецепторы и сопряженные с ними ионные каналы натрия и кальция реализуется ионотропный эффект глутамата, являющегося наиболее распространенным возбуждающим нейротрансмиттером нервной системы [1, 2, 11]. При нарушениях физиологических механизмов выброса в синаптическую щель, транспорта и биохимической трансформации глутамата происходит активация и, при определенных патологических состояниях, последующая альтерация ионотропных глутаматных рецепторов. В этих условиях изменение тока ионов через сопряженные

Таблица 1

Распределение больных с глиомами полушарий большого мозга в контрольной и исследуемой группах по локализации опухоли

| Локализация опухоли                    | Контрольная группа (n = 34) |      | Исследуемая группа (n = 58) |      | Всего |      |
|--|-----------------------------|------|-----------------------------|------|-------|------|
|  | абс.                        | %    | абс.                        | %    | абс.  | %    |
| Лобная доля                            | 12                          | 35,3 | 28                          | 48,3 | 40    | 43,5 |
| Височная доля                          | 7                           | 20,9 | 12                          | 20,7 | 19    | 20,6 |
| Теменная доля                          | 2                           | 5,8  | 6                           | 10,3 | 8     | 8,6  |
| Затылочная доля                        | 1                           | 2,9  |                             |      | 1     | 1,1  |
| Лобная и височная доли                 | 2                           | 5,8  | 4                           | 6,9  | 6     | 6,5  |
| Лобная и теменная доли                 | 2                           | 5,8  |                             |      | 2     | 2,2  |
| Височная и теменная доли               | 4                           | 11,9 | 3                           | 5,2  | 7     | 7,6  |
| Височная и затылочная доли             |                             |      | 2                           | 3,4  | 2     | 2,2  |
| Теменная и затылочная доли             | 2                           | 5,8  |                             |      | 2     | 2,2  |
| Лобная, височная и теменная доли       | 2                           | 5,8  |                             |      | 2     | 2,2  |
| Мозолистое тело с бифронтальным ростом |                             |      | 3                           | 5,2  | 3     | 3,3  |
| Итого                                  | 34                          | 100  | 58                          | 100  | 92    | 100  |

с рецепторами ионные каналы формирует электрофизиологическую базу для возникновения пароксизмального деполяризационного сдвига мембранного потенциала, являющегося нейрофизиологической основой эпилепсии, а также приводит к запуску механизмов некроза и апоптоза нейрона [9, 10].

**Цель работы:** изучение особенностей альтерации AMPA-рецепторов глутамата у больных глиомами полушарий большого мозга, текущих с эпилептическим синдромом.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Обследованы 92 больных глиомами полушарий большого мозга, проходивших обследование и лечение в клинике ИМЧ РАН. Мужчин было 53 (57,6%), женщин – 39 (42,4%). Соотношение мужчин и женщин составило 1,35:1. Возраст больных варьировал от 19 до 84 лет. Исследуемую группу составили 58 (63%) больных, в клинической картине заболевания которых регистрировались эпилептические припад-

ки, контрольную – 34 (37%) больных, у которых эпилептических припадков не наблюдалось. Распределение больных в контрольной и исследуемой группах по локализации опухолей приведено в табл. 1.

В общей серии наблюдений у 4 (4,3%) больных была выявлена пилочитарная астроцитомы, у 22 (23,9%) – фибриллярно-протоплазматическая, у 24 (26,1%) – анапластическая, у 30 (32,6%) – глиобластома, у 3 (3,3%) – олигодендроглиомы, у 1 (1,1%) – анапластическая олигодендроглиомы, у 7 (7,6%) – олигоастроцитомы, у 1 (1,1%) – анапластическая олигоастроцитомы. Распределение больных по степени

злокачественности опухоли в контрольной и исследуемой группах приведено в табл. 2.

В контрольной группе преобладали больные глиомами III и IV степеней анаплазии – 29 (85,3%) (p<0,05). В исследуемой группе соотношение больных глиомами I–II и III–IV степеней анаплазии достоверно не различалось – соответственно 31 (53,4%) и 27 (46,6%) больных.

В фазе клинической компенсации находились 30 (32,6%) больных, в фазе клинической субкомпенсации – 38 (41,3%) больных, в фазе умеренной клинической декомпенсации – 22 (23,9%) больных, в фазе грубой клинической декомпенсации – 2 (2,2%) больных [3]. Достоверных различий по уровню компенсации заболевания в сравниваемых группах не выявлено.

Больные обследованы в рамках диагностического комплекса, включающего оценку соматического и неврологического статуса (n=92), КТ (n=50), МРТ с МР ангиографией (n=42), ЭЭГ (n=92), ПЭТ с 18-FDG и 11C-метионином (n=32). В качестве оценки

Таблица 2

Распределение больных с глиомами полушарий большого мозга в контрольной и исследуемой группах по гистологическому типу и степени злокачественности опухоли

| Гистологический тип [4]                     | Степень анаплазии [8] | Контрольная группа (n = 34) |      | Исследуемая группа (n = 58) |      | Всего |      |
|---|-----------------------|-----------------------------|------|-----------------------------|------|-------|------|
|   |                       | абс.                        | %    | абс.                        | %    | абс.  | %    |
| Пилочитарная астроцитомы                    | I                     |                             |      | 4                           | 6,9  | 4     | 4,3  |
| Фибриллярно-протоплазматическая астроцитомы | II                    | 5                           | 14,7 | 17                          | 29,3 | 22    | 23,9 |
| Анапластическая астроцитомы                 | III                   | 4                           | 11,8 | 20                          | 34,4 | 24    | 26,1 |
| Глиобластома                                | IV                    | 23                          | 67,7 | 7                           | 12,1 | 30    | 32,6 |
| Олигодендроглиомы                           | II                    |                             |      | 3                           | 5,2  | 3     | 3,3  |
| Анапластическая олигодендроглиомы           | III                   | 1                           | 2,9  |                             |      | 1     | 1,1  |
| Олигоастроцитомы                            | II                    |                             |      | 7                           | 12,1 | 7     | 7,6  |
| Анапластическая олигоастроцитомы            | III                   | 1                           | 2,9  |                             |      | 1     | 1,1  |
| Итого                                       |                       | 34                          | 100  | 58                          | 100  | 92    | 100  |

степени альтерации AMPA-рецепторов глутамата использован иммуноферментный метод полуколичественного определения уровня аутоантител в периферической крови (ААТ) к GluR1-субъединице AMPA-рецепторов (GluR1) [5]. В качестве антигена для определения уровня ААТ в сыворотке крови использовали синтетические пептиды, соответствующие N-концевой последовательности аминокислот субъединицы GluR1 AMPA (15 а.о.), полученные методом твердофазного синтеза на полуавтоматическом синтезаторе NPS-400 (Neosystem Laboratory, Франция). Образованный комплекс «антиген – антитело» вы-

Таблица 3

**Сравнительная оценка уровней ААТ к GluR1-субъединице АМРА-рецепторов глутамата у больных исследуемой группы в зависимости от локализации опухоли (n=58)**

| Локализация опухоли   | Уровень ААТ к GluR1-субъединице АМРА-рецепторов глутамата (%) |       |      |
|---|---|-------|------|
|   | М   | σ     | m    |
| Лобная доля (n = 28) <sup>1</sup>                           | 170,54  | 12,11 | 2,29 |
| Височная доля (n = 12) <sup>2</sup>                         | 161,75*   | 16,45 | 4,75 |
| Теменная доля (n = 6) <sup>3</sup>                          | 151,83* **  | 8,13  | 3,32 |
| Мозолистое тело с бифронтальным ростом (n = 3) <sup>4</sup> | 173,33  | 15,18 | 8,76 |
| Лобная и височная доли (n = 4) <sup>5</sup>                 | 174,50  | 19,47 | 9,73 |
| Височная и теменная доли (n = 3) <sup>6</sup>               | 161,33***   | 7,57  | 4,37 |
| Височная и затылочная доли (n = 2) <sup>7</sup>             | 164,50***   | 6,36  | 4,50 |

Примечание: здесь и далее <sup>1-3</sup> – условные обозначения групп сравнения при локализации опухоли в пределах 1 доли; <sup>4-7</sup> – условные обозначения групп сравнения при локализации опухоли в пределах 2 долей; \* – разница достоверна по сравнению с 1 (p<0,05); \*\* – разница достоверна по сравнению с 2 (p<0,05), \*\*\* – разница достоверна по сравнению с 5 (p<0,05).

являлся с помощью вторых антител, меченных пероксидазой хрена. Реакцию оценивали спектрофотометрически при фиксированной длине волны 490 нм. Уровень аутоантител выражали в процентах отношения оптической плотности исследуемого образца оптической плотности образца контрольной группы. Верхний уровень ААТ определен в 110% [5, 6]. Статистическая обработка полученных данных произведена на платформе прикладной лицензионной программы «Statistica 6.0». Перед проведением статистического анализа выборки проведена проверка полученных данных на нормальность распределения по критерию Колмогорова – Смирнова. Вычисляли выборочное среднее (М), среднеквадратичное отклонение (σ), стандартную ошибку среднего (m). Для установления достоверности различий использовали критерий Стьюдента и критерий Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при p < 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе уровней ААТ к (GluR1) выявлено повышение среднего уровня этого показателя на 38 – 58,6% в зависимости от локализации опухоли. При этом отмечалась устойчивая тенденция к увеличению у больных уровня ААТ к (GluR1) при локализации опухоли в лобной доле как при сравнительном анализе в группах по признаку локализации опухоли в пределах 1 доли, так и в группах по признаку локализации в пределах 2 долей (p<0,05). Сравнительная оценка уровней ААТ к (GluR1) у больных исследуемой группы в зависимости от локализации опухоли представлена в табл. 3.

Средний уровень ААТ к (GluR1) в исследуемой группе больных (n = 58) был выше верхней границы нормы на 51,4%. У больных супратенториальными глиомами II степени анаплазии контрольной группы (n = 5) средний уровень ААТ к (GluR1) не выходил за пределы диапазона нормальных значений. У больных супратенториальными глиомами III – IV степени анаплазии контрольной группы (n = 29) средний уровень ААТ к (GluR1) превышал верхнюю границу нормы на 48,5%. Сравнительная оценка уровней ААТ к (GluR1) у больных супратенториальными глиомами I – II и III – IV степеней анаплазии контрольной и исследуемой групп приведена в табл. 4.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные в последние годы высокотехнологичные патоморфологические исследования опухолей головного мозга показали, что глиальные опухоли, по мере увеличения их степени анаплазии, начинают самостоятельно вырабатывать глутамат, обуславливая эффект эксайтотоксичности в анатомических пределах перитуморозной зоны [12, 13]. Подобные особенности бластоматозного роста формируют специфику клинической картины заболевания, в том числе и наличие эпилептического синдрома у данной категории больных.

Реализация эффекта эксайтотоксичности в процессе бластоматозного роста через активацию и последующую альтерацию ионотропных рецепторов глутамата носит стадийный характер и зависит от степени анаплазии опухоли и ее локализации.

В условиях отсутствия достоверных различий в степени злокачественности опухоли и степени клинической компенсации заболевания при воздействии опухоли на лобную и височную доли регистрируется максимальный уровень ААТ к GluR1-субъединице АМРА-рецепторов глутамата, что может отражать неравномерное распределение глутаматных рецепторов этого типа с увеличени-

Таблица 4

**Сравнительная оценка уровней ААТ к GluR1-субъединице АМРА-рецепторов глутамата у больных супратенториальными глиомами II и III–IV степеней анаплазии контрольной и исследуемой групп (n=92)**

| Группа сравнения   | Уровень ААТ к GluR1-субъединице АМРА-рецепторов глутамата (%) |       |       |
|--|---|-------|-------|
|  | М   | σ     | m     |
| Больные с супратенториальными глиомами исследуемой группы (n = 58) <sup>1</sup>                            | 166,52  | 14,21 | 1,87  |
| Больные с супратенториальными глиомами II степени анаплазии контрольной группы (n = 5) <sup>2</sup>        | 100,60**  | 6,65  | 2,98  |
| Больные с супратенториальными глиомами III и IV степени анаплазии контрольной группы (n = 29) <sup>3</sup> | 163,38  | 10,84 | 2,012 |

ем плотности их распределения в данных отделах головного мозга.

При глиомах I–II степени анаплазии альтерация AMPA-рецепторов глутамата развивается с латентным периодом, при этом нарастание уровня ААТ к (GluR1) как критерия повреждения AMPA-рецепторов коррелирует с наличием в клинической картине заболевания эпилептических припадков. По мере увеличения степени анаплазии отмечается нарастание уровня ААТ к (GluR1). У больных с супратенториальными глиомами III и IV степени анаплазии контрольной группы ( $n = 29$ ) уровень ААТ к GluR1 субъединице AMPA-рецепторов глутамата составил  $163,38 \pm 2,01$  %. При высоком уровне ААТ к (GluR1) эпилептических припадков у больных этой группы зарегистрировано не было. Значительное повышение уровня ААТ к GluR1-субъединице AMPA-рецепторов глутамата больных со злокачественными глиомами отражает запуск механизмов некроза клеточных структур перифокальной зоны, реализуемых через глутамат-кальциевый каскад [7, 10], который по темпу развития опережает потенциальную ирритацию мозговых структур с клиническими проявлениями в виде эпилептических припадков.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гранстрем О. К., Дамбинова С. А. Роль глутаматных рецепторов в механизмах формирования эпилепсии // Нейрохимия. — 2001. — Т. 18. — № 1. — С. 19–29.
2. Дамбинова С. А. Нейрорецепторы глутамата. — Л.: Наука, 1989. — 279 с.
3. Лихтерман Л. Б. Клиническая диагностика опухолей больших полушарий головного мозга. М.: Медицина, 1976. — С. 187.
4. Мацко Д. Е., Коршунов А. Г. Атлас опухолей центральной нервной системы (гистологическое строение). — СПб., 1998. — 197 с.
5. Пат. 2112243 Российская Федерация, МПК<sup>6</sup>G01N33/53, С12Q1/04, А61К39/00. Набор «ПА-тест» для диагностики неврологических заболеваний / Дамбинова С. А.; заявл. и патентооблад. Дамбинова С. А. — № 95120299/13; заявл. 29.11.1995; опублик. 27.05.1998. — Бюл. № 6.
6. Поляков Ю. И. Диагностика эпилепсии и оценка степени компенсации болезни в процессе терапии методом биохимического тестирования пароксизмальной активности головного мозга: дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 1997. — 157 с.
7. Farooqui A. A., Haun S. E., Horrocks L. A. Ischemia and hypoxia // Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects / eds. by G. J. Siegel G. J. [et al]. — 5<sup>th</sup> ed. — N.-Y.: Raven press, 1994. — Ch. 42. — P. 867–884.
8. Louis D. N. et al. WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System (2007). — Geneva: WHO Press, 2007.
9. Matsumoto H., Ajmone-Marsan C. Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: interictal manifestations // Exp. Neurol. — 1964. — № 9. — P. 286–304.
10. Olney J. W. New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity // J. Neural. Transm. — 1994. — Vol. 43 (Suppl.). — P. 47–51.
11. Said S. I. Glutamate receptors and asthmatic airway disease // Trends Pharmacol. Sci. — 1999. — Vol. 20. — № 4. — P. 132–135.
12. Sontheimer H. Glutamate and tumor-associated epilepsy // Oncotarget. — 2011. — № 2. — P. 823–824.
13. Takano T. et al. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas // Nat Med. — 2001. — № 7(9). — P. 1010–1015.

## РЕЗЮМЕ

*В. Н. Очколяс, А. Ф. Гурчин, А. А. Скоромец, А. В. Костюкевич*

**Эпилептический синдром в клинической картине заболевания и уровень аутоантител к GluR1-субъединице AMPA-рецепторов глутамата у больных глиомами полушарий большого мозга**

Обследованы 92 больных с глиомами полушарий большого мозга. Использован иммуноферментный метод полуколичественного определения уровня аутоантител к GluR1 субъединице AMPA-рецепторов глутамата. Изучены частота и клинические особенности симптоматической эпилепсии. Изучена реакция AMPA-рецепторов глутамата в зависимости от локализации, степени злокачественности опухоли и особенностей клинического течения заболевания. Показано преимущественное повышение уровня аутоантител к GluR1-субъединице AMPA-рецепторов глутамата у больных с глиомами, текущими с эпилептическим синдромом. При воздействии опухоли на лобную и височную доли регистрируется максимальный уровень аутоантител к GluR1-субъединице AMPA-рецепторов глутамата.

**Ключевые слова:** глиома, эпилептический синдром, AMPA рецепторы глутамата.

## SUMMARY

*V. N. Ochko lyas, A. F. Gurchin, A. A. Skoromets, A. V. Kostyukevich*

**Epileptic syndrome in the clinical picture of the disease and the level of antibodies to GluR1 subunit of AMPA glutamate receptors in the patients with gliomas in the cerebral hemispheres of a brain**

The authors examined 92 patients with gliomas in the cerebral hemispheres. The immunoenzyme method was used for semiquantitative assay of the level of autoantibodies to GluR1 subunit of AMPA receptors of glutamate. Frequency and clinical features of symptomatic epilepsy, the reaction of AMPA receptors of glutamate depending on localization and degree of malignance and features of clinical course of the disease were investigated as well. Marked increase of the level of autoantibodies to GluR1 subunit of AMPA receptors of glutamate was noticed in the patients with gliomas associated with epileptic syndrome. Maximal level of autoantibodies to GluR1 subunit of AMPA receptors of glutamate seen under the effect of the tumor on the frontal and temporal lobes.

**Key words:** glioma, epileptic syndrome, AMPA glutamate receptors.