



Стипендия Л'Ореаль–ЮНЕСКО:

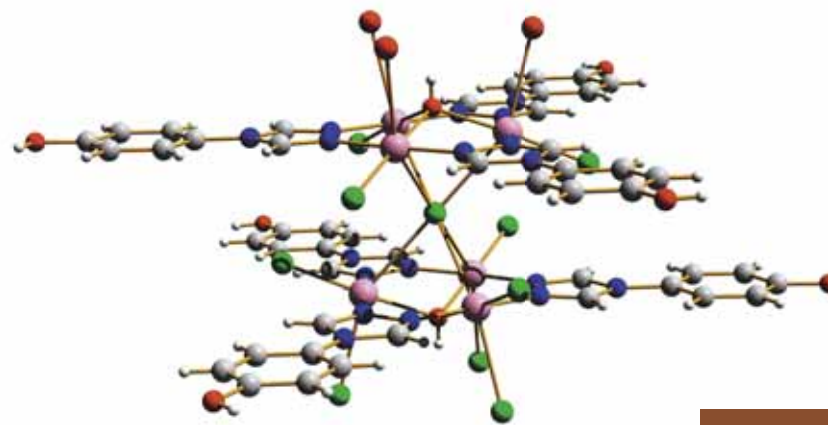
## Красота уму не помеха

В День науки, 10 ноября 2010 г., в Москве состоялось очередное вручение национальной стипендии Л'Ореаль–ЮНЕСКО «Для женщин в науке» размером 350 тыс. рублей.

Программа национальных стипендий Л'Ореаль–ЮНЕСКО сегодня работает в 45 странах мира. В России конкурс проводится с 2007 г. при поддержке Российской академии наук. Соискательницами стипендии могут стать женщины-ученые, кандидаты наук в возрасте до 35 лет, работающие в российских научных институтах и вузах по направлениям: физика, химия, медицина и биология. Принять участие в конкурсе на соискание стипендии, в отличие от других конкурсов, просто – достаточно заполнить небольшую анкету.

В 2010 г. на конкурс поступило 400 заявок из разных городов России. Лауреатами были выбраны десять участниц. Все они – состоявшиеся ученые, известные специалисты в своих областях, руководители научных групп и лабораторий.

На этот раз достойную конкуренцию Москве составили научные учреждения Сибирского отделения РАН: четыре победительницы из десяти работают в Новосибирском научном центре СО РАН. Сегодня мы представляем читателям двух сибирячек: специалиста в области рентгеноструктурного анализа Евгению Пересыпкину, получившую по оценке жюри самый высокий рейтинг среди участников программы, и Светлану Тамкович, участвующую в разработке перспективных методов диагностики онкозаболеваний



### Кристаллохимическая мозаика

Основная задача эмпирической кристаллохимии – поиск общих закономерностей строения кристаллов. Такого рода исследования чрезвычайно важны, поскольку большинство твердых тел, которые нас окружают, имеет кристаллическую природу.

В отличие от других форм материи, в кристаллах атомы расположены упорядоченно. Одним из наиболее плодотворных подходов к описанию кристаллического состояния вещества является обобщение имеющихся данных о разнообразии структур кристаллических твердых тел с помощью так называемого *геометрико-топологического анализа*.

Метод заключается в заполнении пространства кристалла без промежутков и перекрытий *полиэдрами* (многогранниками) *Вороного–Дирихле* так, чтобы внутри каждого из них находился атом. Подобное формальное математическое описание кристаллического пространства просто и элегантно позволяет находить закономерности строения различных классов кристаллических веществ. Именно в эту большую и интересную работу еще студенткой Самарского государственного университета включилась Евгения Пересыпкина:

ПЕРЕСЫПКИНА Евгения Владимировна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории кристаллохимии Института неорганической химии СО РАН (Новосибирск). Лауреат премии Европейской академии для молодых ученых России (2005); премии им. Ю. Т. Стручкова для молодых ученых за лучшую работу в области рентгеноструктурного анализа (2008); стипендиат национальной стипендии Л'Ореаль–ЮНЕСКО для женщин в науке (2010).  
Автор и соавтор 103 научных работ





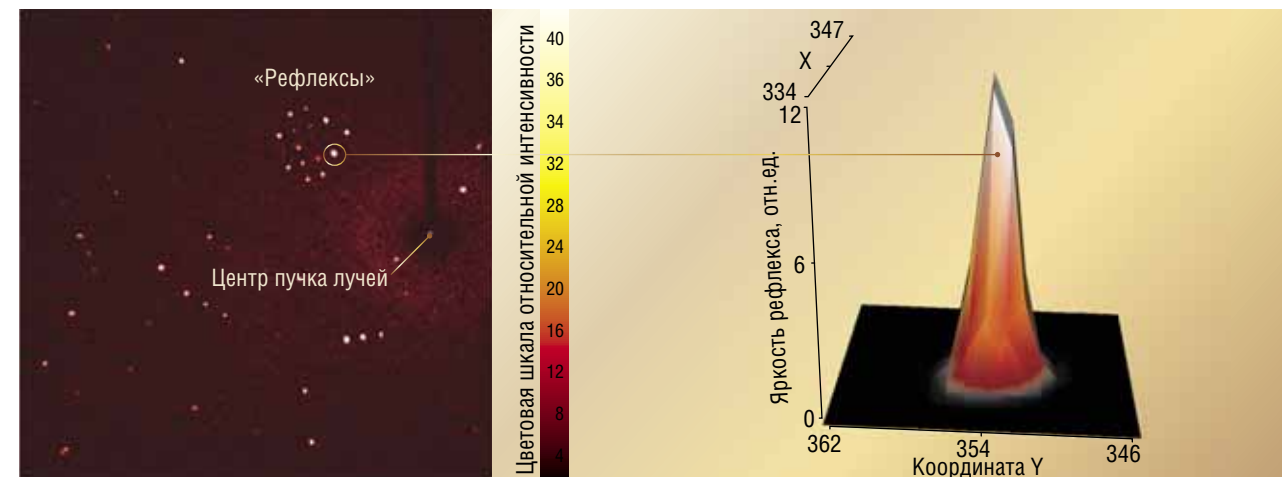
Первая задача – выбрать среди кристаллов один, наиболее подходящий для анализа. Затем его нужно закрепить, например, на нейлоновой нити (толщиной 20 мкм), которая соединяется через специальный держатель с винтом точной регулировки для микрометрического позиционирования



«Мне с самого начала повезло оказаться среди увлеченных людей. Сначала это были родители – кандидаты технических наук, инженеры высокой квалификации, преданные своему делу. Они всю жизнь работали за интерес и на совесть. Потом университет, где пришлось выбирать между “интересно” и “денежно и надежно”. Я, следуя семейной традиции, выбрала первое. На лекциях по квантовой химии профессор В. А. Блатов произвел на меня большое впечатление вдумчивостью, глубиной и оригинальностью рассуждений. В 1996 г. он стал моим научным руководителем. На кафедре неорганической химии, где я оказалась, царил атмосфера научного поиска. Не жалея времени и сил, сотрудники кафедры “возились” со студентами младших курсов, уже на этом этапе привлекая их к серьезной научной работе».

Евгения делала свои первые шаги в науке в условиях, когда единственным способом вести исследования на мировом уровне был уход от затратной экспериментальной науки. Потребовалось создать такие алгоритмы анализа и систематизации кристаллохимических данных, для которых было достаточно только компьютера. В результате под руководством В. А. Блатова, А. П. Шевченко и В. Н. Сережкина был разработан комплекс кристаллохимических программ TOPOS, который сейчас является одним из самых мощных программных продуктов в этой области. Так родилось оригинальное научное направление, в дальнейшем доказавшее свою конкурентоспособность.

Основу кандидатской диссертации Е. В. Пересыпкиной составил анализ *упаковок* (способов взаимного размещения) молекул в кристаллах. В самом начале работы рассматривали лишь *первую координационную сферу* («ближайших соседей», окружающих выбранную центральную молекулу). По мере дальнейшего совершенствования алгоритмов появилась возможность анализировать и дальние координационные сферы. В ходе кропотливой



Рентгеноструктурный анализ кристаллов основывается на дифракции пучка рентгеновских лучей на атомах, упорядоченных в кристаллической решетке. Типичная дифракционная картина (слева) регистрируется при одной из выбранных ориентаций кристалла. Результат отображается в виде множества ярких точек – «рефлексов», образующих упорядоченные зоны. Каждый рефлекс характеризуется своим положением и интенсивностью (справа – трехмерное изображение одного из них). Иногда приходится снимать несколько сотен таких дифракционных картинок при разных положениях кристалла, и только их совокупность дает достаточную информацию для расшифровки кристаллической структуры

работы были изучены 35 тыс. органических и неорганических соединений и найдены интересные закономерности: например, было установлено, что около 90% молекулярных кристаллических структур можно описать достаточно небольшим (не более десятка) числом способов.

За последние семь лет, работая в Институте неорганической химии СО РАН, Е. В. Пересыпкина расширила свой инструментальный диапазон, дополнив багаж теоретических знаний полезными навыками экспериментальной работы в области рентгеноструктурного анализа монокристаллов. В роли объектов исследования выступают кристаллы веществ, синтезированных химиками.

Исследование кристаллической структуры проводится на сложной установке – монокристалльном рентгеновском дифрактометре, принцип работы которого основан на регистрации дифракции рентгеновских лучей при прохождении сквозь кристаллическое вещество. Такой прибор может себе позволить далеко не каждая лаборатория, и только экспериментатор с большим опытом практической работы может грамотно оценить, насколько надежно определяется кристаллическая структура. Если данные о структуре вызывают сомнения, результаты основанного на ней анализа могут оказаться ошибочными.

Работа в этой области, отличаясь большим разнообразием, предъявляет высокие требования к исследователю.

Уже сам поиск пригодного для измерений кристалла – занятие творческое, в котором успеха достигают далеко не все. Нелегко угадать, какую форму должен иметь «правильный» кристалл, найти его среди множества других и обеспечить его сохранность до начала измерений. Нередко кристаллы разлагаются, например, из-за выветривания на воздухе, поэтому всю работу по отбору нужно делать достаточно быстро. Вспомогательные операции требуют умений, схожих с мастерством Левши, подковывающего блоху: нужно поместить крохотный кристаллик размером в десятые доли миллиметра на держатель – хрупкую стеклянную иглу или нейлоновую петлю диаметром в несколько раз тоньше волоса.

Для выбора правильной стратегии эксперимента необходимо хорошо знать кристаллографию – науку, математически описывающую возможные виды симметрии кристаллического вещества. Естественно, что ошибки на любом этапе приводят к тому, что установить структуру синтезированного химиками нового вещества станет невозможно.

По полученным экспериментальным данным, представляющим собой после их математической обработки некую совокупность точек в пространстве, следует расшифровать структуру самого кристалла. Решение головоломки осложняется несколькими факторами. Часть точек – следствие погрешностей эксперимента, их требуется распознать и отбросить. Неизвестно и то,

атому какого именно химического элемента соответствует каждая точка. Наконец, заранее зачастую нельзя сказать, какую структуру предстоит отыскать.

Успех в расшифровке зависит от того, насколько исследователь научился понимать влияние симметрии на структуру кристалла и способен ли он правильно распознавать структурные фрагменты. Совершенно необходимы беспристрастность и непредвзятость, потому что ожидание увидеть желаемое часто мешает найти ответ. Именно поэтому определение кристаллических структур – это каждый раз новый вызов исследователю, ответить на который можно только при наличии достаточной настойчивости и даже, порой, упрямства.

Метод рентгеноструктурного анализа сейчас переживает подлинный расцвет и способствует развитию других разделов химии, которым он дает уникальную информацию о составе и строении только что синтезированных соединений. С другой стороны, каждая расшифрованная структура дает новые фундаментальные данные и для самой кристаллохимии, приближая нас к пониманию строения кристаллов.



### Самый ранний диагноз

Первое место среди всех онкологических заболеваний женщин занимает рак молочной железы: ежегодно в мире им заболевает свыше миллиона человек, и эта цифра постоянно растет. Соответственно, неуклонно возрастает и смертность, хотя с помощью современных методов лечения достигается почти стопроцентная выживаемость на первой стадии болезни. Но на сегодняшний день выявление опухолевого процесса на самой ранней стадии является серьезной проблемой: правильный диагноз ставится не более чем в половине случаев. Около 80 % больных сами случайно обнаруживают у себя опухоль, когда она уже достигла значительных размеров.

Современные методы диагностики рака молочной железы делятся на две категории: инструментальные (маммография, УЗИ и томография) и лабораторные. В странах Западной Европы, а также для диагностики заболевания у женщин старше 35 лет, обычно используется маммография, точность которой составляет 80–98 %. Несмотря на высокую эффективность, этот рентгенологический метод не рекомендуется использовать при обследовании молодых женщин и для наблюдения за опухолевым процессом из-за высоких доз облучения. Женщинам до 35 лет рекомендуется проводить обследование груди при помощи УЗИ, однако этим методом удастся визуализировать не все формы злокачественных заболеваний молочных

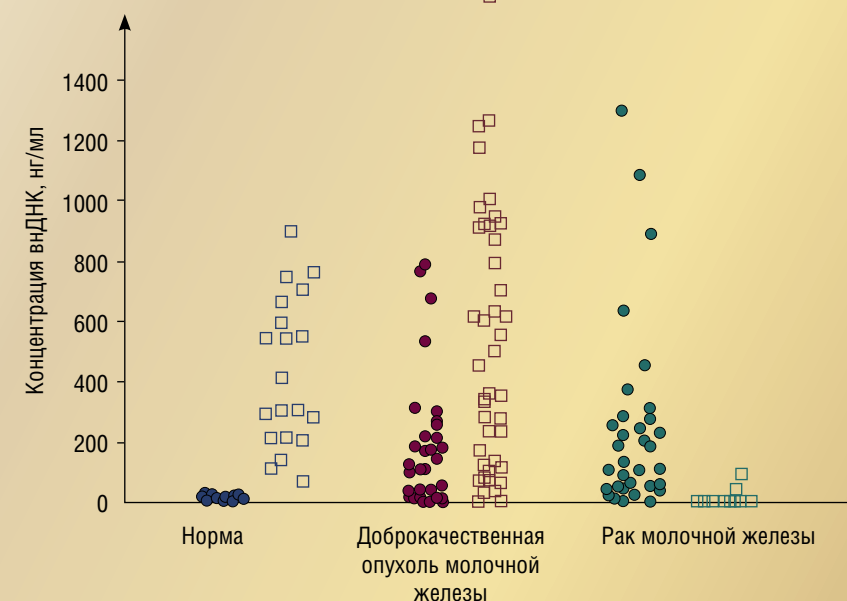
желез, к тому же за патологические структуры иногда принимаются участки жирового перерождения ткани.

Лабораторные иммунохимические и биохимические методы можно использовать лишь при сформировавшейся опухоли, которая секретирует в кровь достаточное количество соответствующих белков-антигенов. Потому эти методы обычно применяют для мониторинга заболевания и оценки эффективности противоопухолевой терапии. Их диагностическую ценность снижает тот факт, что белковые маркеры вообще выявляются лишь у трети онкологических больных, зато в небольших количествах присутствуют в норме, а также при других, не онкологических заболеваниях.

В связи с несовершенством ранней диагностики новообразований молочной железы сегодня интенсивно разрабатываются принципиально новые методические подходы, в том числе базирующиеся на анализе внеклеточных ДНК и РНК.



ТАМКОВИЧ Светлана Николаевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник группы клеточной биологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Старший преподаватель кафедры молекулярной биологии Новосибирского государственного университета. Стипендиат национальной стипендии Л'Ореаль–ЮНЕСКО для женщин в науке (2010). Автор и соавтор 27 научных публикаций, трех учебно-методических пособий; шести патентов РФ и одного европейского патента



Распределение в крови циркулирующей внеклеточной ДНК у здоровых женщин и женщин с опухолями молочной железы значительно различается. В норме почти вся ДНК адсорбирована на поверхности кровяных клеток. При патологии увеличивается концентрация ДНК в плазме крови. При этом при доброкачественных опухолях концентрация ДНК на поверхности кровяных клеток не отличается от таковой у здоровых женщин, а у больных раком – снижается более чем в 30 раз

● в плазме крови  
□ на поверхности кровяных клеток

До недавнего времени считалось, что у высших организмов ДНК локализована исключительно в клеточных структурах – в ядрах клеток и, частично, в митохондриях. В последние годы было установлено, что вне клеток (прежде всего в плазме крови) в норме и при патологиях обнаруживаются внеклеточные нуклеиновые кислоты. Источником их служат клетки различных тканей организма, в том числе опухолевой, гибнущие в результате апоптоза (клеточного «самоубийства») и некроза.

По словам Светланы Тамкович, на исследование внеклеточных нуклеиновых кислот крови ее вдохновил академик В. В. Власов своей лекцией курса «Горячие точки молекулярной биологии». Ее дипломная работа, выполненная под руководством канд. биол. наук П. П. Лактионова, была посвящена разработке адекватных подходов к измерению концентраций циркулирующих в крови нуклеиновых кислот и исследованию этого феномена при различных патологических состояниях.

На сегодня механизмы, ответственные за появление и циркуляцию внеклеточных нуклеиновых кислот, равно как и их биологические функции, изучены недостаточно. Есть данные, что они могут активно секретироваться клетками, причем некоторые из этих нуклеотидных последовательностей встречаются с частотой, отличающейся от таковой в геномной ДНК (Stroun et al., 2009). Кроме того, в составе циркулирующей ДНК обнаруживается и ДНК вирусов, бактерий, ДНК растительного происхождения, а также ДНК плода, появляющаяся в кровотоке уже на первом месяце беременности (Тамкович и др., 2008).

Сегодня во многих развитых странах предпринимаются попытки создать на основе анализа внеклеточной ДНК методы диагностики рака, поскольку опухолевоспецифическую ДНК можно детектировать в крови онкологических больных при наличии новообразования размером менее миллиметра, т. е. состоящую всего из нескольких сотен клеток (Jung et al., 2010). При этом не имеет значение тип и локализация опухоли (Jung et al., 2010).

Важно, что анализ изменений в составе и количестве циркулирующей в крови ДНК может быть использован для раннего выявления злокачественных опухолей любой локализации без гистологического исследования. Этот же метод пригоден и для оценки эффективности противораковой терапии. Однако уловить изменения в пуле внеклеточных ДНК, свидетельствующие о наличии опухолевого процесса, нелегко при использовании только свободных внеклеточных нуклеиновых кислот из плазмы либо сыворотки крови. Эффективность подобной диагностики невелика – от 10 до 50 %.

С. Н. Тамкович и ее коллегам из группы клеточной биологии ИХБФМ СО РАН удалось доказать, что в норме основная (около 90 %) часть внеклеточной ДНК в крови адсорбирована на поверхности кровяных клеток (Тамкович et al., 2005). Циркулирующие ДНК и РНК присоединяются к форменным элементам крови благодаря ионным взаимодействиям, а также связываясь со специфическими рецепторами на клеточной поверхности. Одновременное использование для диагностики суммарной внеклеточной ДНК – как свободной, так и связанной с поверхностью кровяных клеток – позволяет в 95 % случаев обнаружить рак

уже на I стадии, а также дифференцировать больных с доброкачественными опухолями.

Именно такой подход к диагностике злокачественных новообразований был использован специалистами группы клеточной биологии ИХБФМ СО РАН при разработке новой диагностической платформы на рак молочной железы. Идеологическая основа проекта была заложена еще в 2004 г., и тогда же, на соответствующей времени технологической базе, была показана принципиальная возможность его осуществления.

По сравнению с широко распространенными методами анализа на онкомаркеры новая диагностическая платформа имеет ряд существенных преимуществ.

Во-первых, традиционные генетические методы диагностики рака основаны на выявлении злокачественных мутаций генов. Однако частота встречаемости подобных мутаций может сильно варьировать в зависимости от типа опухоли. Поэтому даже при использовании обширного набора маркерных мутаций нельзя абсолютно безошибочно распознать процесс онкотрансформации.

В качестве молекулярно-генетических маркеров циркулирующей ДНК для ранней онкодиагностики они используют так называемые *эпигенетические маркеры*, позволяющие выявлять гиперметилирование промоторных (регуляторных) областей ряда генов. К последним относятся гены, участвующие в регуляции клеточного цикла, а также в запуске апоптоза, клеточной дифференцировке, репарации ДНК и т. д. Полная дезактивация регуляторных областей приводит к тому, что даже в отсутствии в генах каких-либо структурных изменений они становятся неактивными, в результате

чего клетка может переродиться в опухолевую. Поэтому использование эпигенетических маркеров намного повышает точность диагностики.

Во-вторых, для эффективного выделения и очистки внеклеточной ДНК из крови сибиряки используют собственные оригинальные разработки (на эти технологии было получено 6 патентов РФ и 1 европейский).

Сейчас исследователи работают над оптимизацией стадий анализа без снижения достоверности и чувствительности метода, приводя его в соответствие современным стандартам клинической лабораторной диагностики. Для этого требуется упростить процедуру обработки крови и перейти на новый метод детекции маркерных генетических последовательностей (мультиплексный ПЦР-анализ в реальном времени).

Для подтверждения диагностической значимости нового метода создается обширная информационная база данных и коллекция образцов крови пациентов с известным диагнозом, а также первично обратившихся с подозрением на опухоль. Эта работа ведется в сотрудничестве с Новосибирским областным онкологическим диспансером, женской консультацией Центрального района и ЦКБ Советского района г. Новосибирска.

Немаловажное значение для будущего нового метода диагностики рака груди имеет и тот факт, что он является неинвазивным (т. е. не нуждающимся в проведении биопсии для гистологического анализа) и не требует дорогостоящего оборудования. Значит, его можно широко применять для оценки эффективности противоопухолевой терапии, а также в скрининговых программах по выявлению этого широко распространенного онкозаболевания.