

Ж.А.Миронова, В.И.Трофимов, Е.И.Всеволодская, В.А.Белаш, М.В.Дубина

Роль изоформ глюкокортикоидного рецептора в формировании стероидорезистентности у больных бронхиальной астмой

ГБОУ ВПО "Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова" Минздрава России: 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8

Zh.A.Mironova, V.I.Trofimov, E.I.Vsevolodskaya, V.A.Belash, M.V.Dubina

Glucocorticoid receptor isoforms and steroid resistance in patients with bronchial asthma

Key words: glucocorticoid receptor, steroid resistance, bronchial asthma.

Ключевые слова: глюкокортикоидный рецептор, стероидорезистентность, бронхиальная астма.

Благодаря многочисленным противовоспалительным эффектам действия глюкокортикостероидов (ГКС) использование их в качестве базисной терапии общепризнано. Снижение стероидочувствительности, развитие стероидорезистентности (СР) является одной из важных проблем на пути достижения контроля многих заболеваний: бронхиальная астма (БА), болезнь Крона, язвенный колит, ревматоидный артрит и др. Противовоспалительный эффект ГКС реализуется через взаимодействие с глюкокортикоидным рецептором (ГР) и ядерную транслокацию комплекса ГКС–ГР, что приводит к изменению экспрессии генов, ассоциированных с воспалением [1].

При анализе широкогеномных исследований показано, что до 20 % генов регулируются ГКС, причем 50 % из них – на позитивный манер, т. е. активируются противовоспалительные гены [2].

ГР, имеющий модульную структуру – член ядерного семейства рецепторов, который при связывании с родственным лигандом непосредственно или косвенно регулирует транскрипцию генов-мишеней. Ген ГР состоит из 9 экзонов. Основными доменами являются: лиганд-связывающий, который содержит концевую карбоксильную группу с последовательностью AF-2, необходимую для связывания с коактиваторами; азотистый, содержащий область AF-1, необходимую для гормон-независимой активации транскрипции; центральный ДНК-связывающий, включающий 2 цинк-фингерные последовательности. Цинк-фингерные последовательности присоединяют ГР к особым последовательностям ДНК генов-мишеней, известных как гормон-отвечающий элемент (ГОЭ) [3]. Активность ГР регулируется как минимум 3 разными промоторами: 1A, 1B, 1C, благодаря чему возможна альтернативная инициация транскрипции и как результат – специфическая для разных видов клеток регуляция экспрессии гена [4].

На разнородность изоформ ГР оказывают влияние факторы, контролирующие процесс альтернативного сплайсинга (процесс вырезания кодирующей части – экзонов) прематричной рибонуклеиновой кислоты (пре-мРНК) ГР. Для создания мРНК ГР необходимо участие > 60 полипептидов, включая семейство серин-аргинин-богатых белков, известных как белки SR. Белки SR играют двойную роль в сплайсинге пре-мРНК ГР, они вовлечены также в конституционный и альтернативный сплайсинг. Клетки экспрессируют факторы SRp30a, SRp30b и SRp30c. Фактор нейтрофилов – SRp30c – необходим для альтернативного сплайсинга пре-мРНК ГР, чтобы создать мРНК, кодирующую ГРβ. Белки SR могут быть привлекательными мишенями для терапевтического воздействия в будущем. Многочисленные изоформы ГР обусловлены полиморфными вариантами гена NR3C1, альтернативным сплайсингом и инициацией альтернативной трансляции [5].

Известно 6 изоформ ГР. В аспекте БА наиболее значимыми являются изоформы ГРα и ГРβ, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга. Изоформа ГРβ, имеющая усеченный карбоксильный терминал, не способна связывать лиганд и является биологическим ингибитором действия ГКС, определяя таким образом чувствительность тканевой мишеней к ГКС. В норме соотношение мРНК ГРα / мРНК ГРβ варьирует в пределах 40–2 800 : 1 [6, 7].

Максимальная экспрессия ГРα обнаружена в тканях мозга, скелетных мышцах, легких, печени, почках и мононуклеарах периферической крови. Наименьшая экспрессия ГРα выявлена в сердце, слизистой ободочной кишки. Низким уровнем экспрессии ГРα в нейтрофилах объясняется их пониженная чувствительность к ГКС; мРНК ГРβ выявлена во всех клетках воспаления: моноцитах, лимфоцитах, эозинофилах, макрофагах, нейтрофилах, а также в печени,

скелетной мышце, почках, легких, головном мозге, слизистой носа, сердце.

Впервые в 2007 г. было показано, что ГР β обладает самостоятельной транскрипционной активностью, изменяя работу > 5 тыс. генов [8].

В отсутствие лиганда ГР неактивен и располагается в цитоплазме, образуя комплекс с несколькими белками: hsp90 (*heat shock protein*), hsp70, hsp56, hsp40, иммунофилином p59, фосфопротеинами p23, p60, ГК-связывающим белком (FKBP). Центральную роль в этом комплексе играет hsp90, соединяющийся с лиганд-связывающим доменом, который может маскировать ядерные сигналы, локализованные в этом локусе, а также обеспечивает нахождение свободного ГР в цитоплазме клетки. Образующийся комплекс способствует "свертыванию" молекулы ГР в конформационную структуру, оптимальную для связывания с ГКС, а также предупреждает проникновение ГР, не связанного с лигандом, в ядро. В результате транслокация комплекса ГКС-ГР в ядро возможна только после связывания ГР с лигандом и диссоциации hsp90 из комплекса ГКС-ГР под воздействием ядерных белков: импортин- α (кариоферин- β) и импортин-13 [9] и FKBP51 [2].

Выделяются 3 основных механизма, с помощью которых ГКС могут регулировать транскрипцию гена.

В активированном состоянии комплекс ГКС-ГР проникает в ядро, где образуются пары ГР-гомомеров, способные взаимодействовать с ГОЭ генов-мишеней, а также связываться с транскрипционными коактиваторами [10].

В случае положительного регулирования гомодимер может соединиться с позитивным ГОЭ, расположенным в промоторной области ГКС-отвечающего гена, осуществляя позитивную индукцию транскрипции и запуская синтез противовоспалительных факторов.

При взаимодействии с негативным ГОЭ с помощью ГР осуществляется репрессия транскрипции гена, тормозя тем самым синтез провоспалительных факторов и выступает в качестве посредника в развитии побочных эффектов ГКС, таких как ингибирование остеокальцина, который вовлечен в синтез кости. Оба механизма относятся к т. н. геномному эффекту действия ГКС [9].

Однако при использовании ГКС может уменьшаться транскрипция генов, вовлеченных в воспалительный процесс, которые не имеют ГОЭ в промоторной области, т. е. имеет место и внегеномный механизм. Ингибиторный эффект ГКС обусловлен белок-белковым взаимодействием между активированным ГР и транскрипционными факторами активирующего протеина-1 (AP-1) и ядерным фактором κ B (NF- κ B), которые опосредуют экспрессию генов воспаления и активируются под влиянием медиаторов воспаления, вирусов [11]. Итогом трансрепрессии генов является торможение транскрипции воспалительных генов, к которым относятся: цитокины: интерлейкины (IL) 1–6, 9, 11–13, 16–18, фактор некроза опухоли- α , GM-CSF; хемокины: IL-8,

RANTES, эотаксин, воспалительный белок макрофагов, индуцибельная синтаза оксида азота, оксид азота, который стимулирует пролиферацию Th2 и повышает проницаемость сосудистой стенки, индуцибельная циклооксигеназа, которая участвует в образовании простагландинов, эндотелин-1, обладающий бронхоконстрикторным эффектом и участвующий в развитии субэпителиального фиброза, молекулы адгезии лейкоцитов (ICAM-1; *E-selectin*), цитоплазматическая фосфолипаза A2, которая катализирует синтез арахидоновой кислоты, рецептор субстанции P (рецепторы Nk1, Nk2).

В регуляции экспрессии и репрессии генов решающим моментом является изменение структуры хроматина вследствие ферментативной модификации основных гистонов. В неактивном состоянии ДНК плотно обвивает гетерооктомер, исключая закрепление полимеразы РНК II, которая активирует синтез мРНК. Такая конформационная структура хроматина трактуется как закрытая и связана с супрессией генетической экспрессии. Ацетилирование радикалов лизина гистонов промотора с помощью коактиваторов индуцирует деспирализацию ДНК, делает хроматин менее плотным и доступным для РНК-полимеразы II, запуская тем самым транскрипцию гена. ГР блокируют коактиваторы или присоединяют корепрессоры, обладающие ацетилтрансферазной активностью. К коактиваторам относятся: CREB-связывающий белок, коактиватор стероидного рецептора и другие транскрипционные факторы [10]. Таким образом, трансактивация связана с повышением ацетилирования гистонов, а гипoaцетилирование коррелирует с подавлением транскрипции или с генетическим молчанием [11].

Гены, которые активируются под воздействием ГКС, отвечают за синтез белков, обладающих противовоспалительным эффектом. К ним относятся: липопротеин-1 (аннексин-1), который тормозит фосфолипазу A2 и продукцию арахидоновой кислоты, нейтральная эндопептидаза, которая разрушает брадикинин и тахикинин, β_2 -AP, секреторный ингибитор лейкопротеаз (SLPI), фосфатаза-1 MAP-киназы, ингибитор NF- κ B (I- κ B), IL-10, который уменьшает транскрипцию провоспалительных цитокинов и хемокинов, CD 163, антагонист рецептора IL-1, GILZ – глюкокортикоид-индуцибельный лейцин zipper, который предотвращает связывание AP-1 с ДНК. Эти эффекты содействуют противовоспалительному действию ГКС [9].

Интересные данные были получены в исследовании по оценке экспрессии ГР α и ГР β в клетках эпителия и подслизистого слоя дыхательных путей у больных БА в зависимости от степени тяжести заболевания. Повышенный уровень экспрессии ГР α наблюдался у пациентов с тяжелой БА по сравнению с больными БА средней степени тяжести (СБА) [12]. В другом исследовании было выявлено, что у пациентов с БА, смерть которых наступила в реанимационном отделении, несмотря на терапию высокими дозами ГКС, отмечался повышенный уровень экспрессии изоформ ГР β в иммунореактивных клетках

бронхов разного диаметра. При этом большинство клеток с повышенной экспрессией $\text{GR}\beta$ были лимфоцитами, в меньшей степени – эозинофилами, макрофагами и нейтрофилами [13].

У больных БА тяжелой степени, получающих высокие дозы таблетированных ГКС (тГКС), в нейтрофилах после экспозиции IL-8 наблюдалось увеличение экспрессии изоформ $\text{GR}\beta$, что может обеспечивать механизм, благодаря которому эти клетки избегают ГКС-индуцированной гибели [14]. Кроме того, клетки Th17 могут выступать в роли посредника при нейтрофильном воспалении и характеризоваться продукцией IL-17, IL-22 и IL-6. *In vitro* цитокины Th17 нечувствительны к действию дексаметазона, несмотря на адекватную ядерную транслокацию GR [15].

Одной из причин развития СР у больных БА является нарушение ядерной транслокации GR, несмотря на высокую концентрацию ГКС, что приводит к уменьшению противовоспалительного действия. Активация GR, его связывание с лигандом и продвижение в ядро осуществляется за счет обмена белков FKBP51 на FKBP52 в комплексе с hsp90. Десенситизация GR может осуществляться через FKBP51, что приводит к снижению эффективности действия ГКС. Кроме того, повышение экспрессии FKBP51 способствует увеличению активности NF- κ B [2].

Одним из основных механизмов противовоспалительной активности ГКС является гиперэкспрессия гистон-деацетилазы-2 (HDAC2). HDAC2 участвует в деацетилировании основных гистоновых белков, что усиливает степень конденсации ДНК провоспалительных генов и блокирует их транскрипцию. Изоформы $\text{GR}\beta$, подавляя активность HDAC2, могут усиливать транскрипцию провоспалительных генов [16].

Известны данные о способности GR оказывать воздействие на многие провоспалительные транскрипционные факторы и молекулы внутриклеточной сигнализации.

GR после связывания с ГКС взаимодействует в ядре с транскрипционным фактором NF- κ B и нарушает его способность стимулировать транскрипцию провоспалительных генов [17]. NF- κ B, в свою очередь, может блокировать транскрипцию глюкокортикоид-отвечающих генов [18] и изменять соотношение изоформ $\text{GR}\alpha/\beta$ в клетке [19]. ГКС могут повышать экспрессию противовоспалительного фактора I- κ B-ингибитора NF- κ B [16, 20].

Помимо этого, $\text{GR}\alpha$ может взаимодействовать с провоспалительным транскрипционным фактором AP-1, что приводит к прерыванию передачи провоспалительного сигнала [21]. В то же время $\text{GR}\beta$ может связывать сайты ДНК для AP-1, например, в промоторе генов IL-5, IL-13, что, в свою очередь, подавляет их активацию и оказывает противовоспалительный эффект.

Транскрипционные факторы GATA3 и Tbet влияют на дифференцировку наивных Т-лимфоцитов по Th1-, либо по Th2-пути, что в конечном счете определяет тип воспаления. Изоформы $\text{GR}\beta$ могут подав-

лять GATA3 – опосредованную трансактивацию генов IL-5, IL-13. Интересно, что в этой ситуации $\text{GR}\beta$ выступает в качестве агониста $\text{GR}\alpha$, обладающего тем же эффектом [19]. Кроме того, изоформы $\text{GR}\alpha$ при взаимодействии с активатором транскрипции Tbet могут приводить к нарушению связывания Tbet с ДНК генов, ассоциированных с Th1-ответом [22]. Таким образом, изоформы GR могут влиять на поляризацию Th1/2-ответа и формирование эндотипа БА.

GR при связывании с ГКС может взаимодействовать с транскрипционным фактором STAT5, который инициирует Th-17-ответ, ассоциированный с нейтрофильным воспалением. Это приводит к регулированию экспрессии соответствующих провоспалительных генов. Экспериментально показано, что изоформы $\text{GR}\beta$, формируя неактивные комплексы с $\text{GR}\alpha$, могут выступать в качестве ингибитора JAK-STAT-системы, которая имеет большое значение в патогенезе многих хронических воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в т. ч. при БА [17].

Таким образом, изоформы GR играют важную роль в формировании СР за счет различных механизмов, что, в конечном итоге, определяет ответ на терапию ГКС.

На кафедре терапии госпитальной им. акад. М.В.Черноруцкого ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. акад. И.П.Павлова было выполнено исследование по оценке экспрессии изоформ GR у больных БА в зависимости от степени тяжести заболевания.

В исследование (дизайн "случай–контроль") были включены жители Северо-Западного региона России, европеоиды, не связанные родством. Диагноз БА устанавливался в соответствии с классификацией и критериями Международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА [23] и Российского руководства по диагностике, лечению и профилактике БА [24].

Был выполнен анализ уровня экспрессии мРНК $\text{GR}\alpha$ и мРНК $\text{GR}\beta$ у больных БА ($n = 37$): с гормонозависимой БА (ГЗБА; $n = 9$); БА легкого течения (ЛБА; $n = 14$); СБА ($n = 7$); группу контроля составили практически здоровые лица ($n = 7$). У больных ЛБА ($n = 5$), которым впервые была назначена терапия ингаляционными (иГКС) и внутривенными (вГКС) в период обострения, а также у пациентов с СБА ($n = 5$), которым к базовой терапии иГКС были назначены вГКС, образцы крови брались до начала и через 2 нед. лечения, пациентам с ГЗБА – однократно на фоне длительной терапии иГКС и тГКС. У всех пациентов проводилась терапия β_2 -агонистами.

Детекция продуктов полимеразной цепной реакции проводилась методом линейных разрушаемых проб с флуорофором и гасителем флуоресценции (*TaqMan*-зонды); в качестве эндогенного внутреннего контроля использовался G-белок – продукт гена GNB2L1 (OMIM 176981). Для повышения точности результатов все образцы исследовались в 3 повторах (трипликатах). Результаты исследования обрабатывались с помощью компьютерной программы *Statistica 6.0* (*StatSoft Inc.*, США).

У больных ГЗБА экспрессия ГР α была выше, чем у больных СБА до лечения вГКС: 34,2 (15,0; 101,3) и 1,3 (0,3; 14,1) ед. соответственно ($p = 0,023$). У больных СБА ($n = 7$) уровень экспрессии ГР α коррелировал с длительностью терапии иГКС ($r = 0,899$; $p = 0,006$;) и длительностью лечения системными ГКС ($r = 0,894$; $p = 0,041$; $n = 5$). В то же время в группе больных СБА после лечения вГКС экспрессия ГР β была ниже, чем в группе контроля: 1,5 (1,3; 3,1) и 24,6 (6,2; 68,1) ед. соответственно ($p = 0,042$). У больных СБА ($n = 5$) выявленная корреляция между уровнем экспрессии ГР β и содержанием нейтрофилов в периферической крови после лечения показала, что ГКС действуют на экспрессию ГР β , подавляя ее, но не оказывают влияния на нейтрофильное воспаление ($r = -0,9$; $p = 0,037$). У пациентов с СБА длительная терапия иГКС в сочетании с высокими дозами вГКС способствовала повышению уровня ГР α . Полученные результаты не согласуются с исследованием, согласно которому, экспрессия изоформ ГР не коррелирует с симптомами БА и дозой ГКС [25]. Вероятно, повышение экспрессии ГР β до лечения ГКС связано с воспалительным процессом и цитокин-опосредованной их активацией [26].

Заключение

При анализе полученных результатов подтвердилась гипотеза о том, что аллергическое или инфекционное воспаление может вызывать дисбаланс в экспрессии изоформ ГР в сторону увеличения ГР β . Все обследуемые пациенты были стероидочувствительными, среди них не было пациентов с СР. Было показано, что экспрессия мРНК изоформ ГР различалась у больных БА в зависимости от степени тяжести заболевания. Кроме того, на соотношение изоформ ГР α и ГР β влияли длительность терапии и дозы ГКС. Возможно, после завершения исследования на большей выборке пациентов изоформы ГР можно будет рассматривать в качестве маркера стероидочувствительности и эффективности глюкокортикоидной терапии у больных БА. Кроме того, это открывает возможности для создания новых мишеней лекарственного воздействия с помощью экспрессии, воспроизводимой на уровне РНК, что является перспективным направлением персонализированной медицины.

Литература

1. Barnes P.J., Woolcock A.J. Difficult asthma. Eur. Respir. J. 1998; 12: 1209–1218.
2. Newton R., Leigh R., Gienbycz M.A. Pharmacological strategies for improving the efficacy and therapeutic ratio of glucocorticoids in inflammatory lung disease. Pharmacol. Ther. 2010; 125: 286–327
3. Adcock I.M., Caramori G. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. Immunol. Cell. Biol. 2001; 79: 376–384.
4. Breslin M.B., Geng C.D., Vedeckis W.V. Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids. Mol. Endocrinol. 2001; 15: 1381–1395.
5. Lu N.Z., Cidowski J.A. The origin and functions and multiple human glucocorticoid receptor isoforms. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2004; 1024: 102–123.
6. Xu Q., Leung D.Y.M., Kisich K.O. Serine-arginine-rich protein p30 directs alternative splicing of glucocorticoid receptor pre-mRNA to glucocorticoid receptor beta in neutrophils. J. Biol. Chem, 2003; 278 (29): 27112–27118.
7. Ling-bo Li., Leung D., Hall C. et al. Divergent expression and function of glucocorticoid receptor β in human monocytes and T-cells. J. Leucocyte Biol. 2006; 79: 818–827.
8. Lewis-Tuffin L.J., Jewell C.M., Bienstock R.J. et al. Human glucocorticoid receptor binds RU-486 and is transcriptionally active. Mol. Cell. Biol. 2007; 27: 2266–2282.
9. Barnes P. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2010; 120 (2–3): 76–85.
10. Adcock I.M., Barnes P.J. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. Chest 2008; 134: 394–401.
11. Li B., Carey M., Workman J.L. The role of chromatin during transcription. Cell 2007; 128: 707–719.
12. Bergeron C., Fukakusa M., Olivenstein R. et al. Increased glucocorticoid receptor- β expression, but not decreased histone deacetylase 2, in severe asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 2006; 117 (3): 703–704.
13. Christodoulopoulos P., Leung D.Y.M., Elliott M.W. et al. Increased number of glucocorticoid receptor- β -expressing cells in the airways in fatal asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 2000; 106 (3): 479–484.
14. Strickland I., Kisich K., Hauk P.J. et al. High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids. J. Exp. Med. 2001; 193 (5): 585–593.
15. Mc Kinley L., Alcorn J.F., Peterson A. et al. Th17-cells mediate steroid-resistant airway hyperresponsiveness in mice. J. Immunol. 2008; 181: 4089–4097.
16. Kelly A., Bowen H., Jee Y.K. et al. The glucocorticoid receptor beta isoform can mediate transcriptional repression by recruiting histone deacetylases. J. Allergy Clin. Immunol. 2008; 121 (1): 203–208.
17. Migliaccio G., Sanchez M., Masiello F. et al. The dominant negative isoform of the glucocorticoid receptor is uniquely expressed in erythroid cells expanded from polycythemia vera patients. J. Cell. Physiol. 2011; 223, 460–470.
18. Ling-bo Li, Leung D.Y.M., Martin R.J., Goleva E. Inhibition of histone deacetylase 2 expression by elevated glucocorticoid receptor b in steroid-resistant asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2010; 182: 877–883.
19. Pujols L., Mullol J., Torrego A., Picado C. Glucocorticoid receptors in human airways. Allergy 2004; 59 (10): 1042–1052.
20. Pujols L., Mullol J., Torrego A., Picado C. Glucocorticoid receptors in human airways. Allergy 2004; 59 (10): 1042–1052.
21. Unal R. Subunit Selectivity of the Crosstalk Between GR and AP-1. Diss., MD. Karlshure; 2003.
22. Liberman A.C., Refojo D., Druker J. et al. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. FASEB. J. 2007; 21 (4): 1177–1188.
23. Global Initiative for Asthma (GINA). Updated 2008.
24. Чучалин А.Г. (ред.), Трофимов В.И. (сост.) Руководство по диагностике, лечению и профилактике бронхиальной астмы. М.: НТЦ КВАНТ; 2005.

25. *Jakiela B., Bochenek G., Sanak M.* Glucocorticoid receptor isoforms in steroid-dependent asthma. *Pol. Arch. Med. Wewnęt.* 2010; 120 (6): 214–221.
26. *Torrego A., Pujols L., Roca-Ferrer J. et al.* Glucocorticoid receptor isoforms alpha and beta in in vitro cytokine-induced glucocorticoid insensitivity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004; 170 (4): 420–425.

Информация об авторах

Миронова Жанна Александровна – д. м. н., доцент кафедры терапии госпитальной с клиникой ГБОУ ВПО "ПСПбГМУ им. акад. И.П.Павлова" Минздрава России; тел.: (812)-499-68-98; e-mail: zhanmir@mail.ru

Трофимов Василий Иванович – д. м. н., профессор, зав. кафедрой терапии госпитальной с клиникой ГБОУ ВПО "ПСПбГМУ им. акад.

И.П.Павлова" Минздрава России; тел.: (921) 913-13-28; e-mail: trofvj@mail.ru

Всеволодская Елена Ивановна – заочный аспирант, врач-терапевт кафедры терапии госпитальной с клиникой ГБОУ ВПО "ПСПбГМУ им. акад. И.П.Павлова" Минздрава России; тел.: (921) 420-87-04; e-mail: i420-lena-8704@yandex.ru

Белаш Василий Алексеевич – очный аспирант, врач-терапевт кафедры терапии госпитальной с клиникой ГБОУ ВПО "ПСПбГМУ им. акад. И.П.Павлова" Минздрава России; тел.: (921) 928-22-38; e-mail: vashobelash@rambler.ru

Дубина Михаил Владимирович – д. м. н., профессор, чл.-корр. РАН, руководитель отдела молекулярно-генетических и нанобиологических технологий ГБОУ ВПО "ПСПбГМУ им. акад. И.П.Павлова" Минздрава России; тел.: (812) 347-55-46; e-mail: m.dubina@spmu.rssi.ru

Поступила 06.02.14

© Коллектив авторов, 2014

УДК 616.248-085.357.45-092