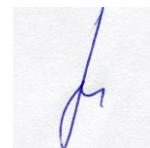


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Воронежский государственный университет»

На правах рукописи



Башмаков Виктор Юрьевич

БИОХИМИЧЕСКАЯ И ЭКСПРЕССИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПУТЕЙ
РАЗОБЩЕНИЯ ДЫХАНИЯ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО
ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ И
СВЕТЛОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ПОЧКИ

Специальность 03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный
руководитель доктор
биологических наук,
профессор Попов В. Н.

Воронеж 2015

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Митохондрии и окислительный стресс	10
1.1.1. Физиология и метаболизм митохондрий.....	10
1.1.2. Активные формы кислорода.....	11
1.2. Патологии и окислительный стресс.....	16
1.2.1. Диабет.....	20
1.2.2. Онкологические заболевания.....	31
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	30
2.1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1.1. Объект исследования.....	40
2.1.2. Методы исследования	40
2.1.2.1 Администрирование аллоксана и SkQ1.....	40
2.1.2.2 Взятие образцов тканей.....	41
2.1.2.3 Экстракция тотальной РНК.....	41
2.1.2.4 Проведение аналитического электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле.....	43
2.1.2.5 Проведение реакции обратной транскрипции.....	44
2.1.2.6 Проведение qPCR.....	44
2.1.2.7 Микрочиповый анализ генной экспрессии.....	46
2.1.2.8 Изоляция митохондрий.....	47
2.1.2.9 Измерение скорости дыхания и продукции перекиси водорода митохондриями.....	48
2.1.2.10 Измерение концентрации белка.....	49
2.1.2.11 Статистическая обработка данных.....	49
2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	50
2.2.1. Окислительный стресс при диабете 1 типа.....	50
2.2.1.1 Дифференциальная экспрессия генов поджелудочной железы.....	50
2.2.1.2. Экспрессия генов белков-компонентов системы защиты от АФК в клетках поджелудочной железы крыс.....	63

2.2.1.3 Изучение влияния SkQ1 на экспрессию генов окислительного метаболизма.....	72
2.2.1.4 Эксперименты на изолированных митохондриях.....	77
2.2.2. Изучение светлоклеточного ПКР.....	85
2.2.2.1 Снижение уровня генной экспрессии окислительных метаболических путей при светлоклеточном раке почки.....	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	99
ВЫВОДЫ	106
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	108
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	129
Приложение 1. Дифференциальная экспрессия генов белков наиболее метаболически активных биохимических путей при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме.....	130

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

АМФ – аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

Ацетил-КоА – ацетил-Кофермент А

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИДГ – изоцитрат дегидрогеназа

ЛДГ – лактат дегидрогеназа

ПКР – почечно-клеточный рак

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СОД – супероксид дисмутаза

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ЭГТА – этиленгликольтетраацетат

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфат

GPx – глутатион пероксидаза

GSH – восстановленный глутатион

RCC – renal cell carcinoma

qPCR – количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Современный мир переживает подъем встречаемости хронических заболеваний, в той или иной степени связанных со старением, будь то сердечно-сосудистые заболевания или рак. Некоторые метаболические заболевания, например, диабет, также ассоциированы с повышенным уровнем окислительного повреждения биомолекул свободными радикалами. Более 300 миллионов человек в мире подвержены этому заболеванию, и ситуация не обещает благоприятного прогноза на будущее [35]. К 2030 году официальное число пациентов возрастет как минимум вдвое [2]. Кроме того, помимо медико-социальных и демографических проблем, связанных с распространением диабета, несомненно также экономическое влияние. По данным Американской Ассоциации Диабета в 2012 году тотальный ущерб экономике страны от диагностированного диабета составил 245 миллиардов долларов, включая прямые медицинские затраты и косвенный ущерб, выраженный в потере продуктивности [5]. В состоянии непрерывного и интенсивного образования АФК степень окислительного повреждения ДНК становится более значительной, что ведет к возникновению геномной нестабильности и увеличивает риск развития опухолей, еще одной группы социально значимых заболеваний. Эндогенно образуемые АФК могут привести к химическим модификациям пуринов и пиримидинов, которые в свою очередь влияют на целостность генов [136]. Любое вовремя не устраненное окислительное повреждение может стать фиксированной мутацией, что увеличивает риск канцерогенеза. Исследования показывают, что наличие диабета ассоциировано с повышенным риском возникновения рака [58, 114, 141, 180, 182, 183]. Также диабет связан с повышенной смертностью при онкозаболеваниях [3, 58, 74, 103]. Диабет и гипергликемия усиливают окислительный метаболизм и продукцию свободных радикалов, которые могут вносить в ДНК разрывы, делеции, инсерции, перестройки, а также

активировать онкогены или выключать гены-супрессоры опухолей, меняя контроль за событиями клеточного цикла [86].

До сих пор нет лекарства ни от диабета, ни от рака, и далеко не все типы диабета возможно предотвратить, так же как триггерные механизмы самой патологии не до конца изучены. Однако не оставляет сомнения факт, что ключевую роль в развитии диабета и онкозаболеваний играет ЭТЦ митохондрий, являясь главным источником АФК в клетке. Диагностика социально значимых заболеваний является одной из приоритетных задач многих систем здравоохранения в мире. Для этих целей разрабатываются и внедряются в рутинную клиническую практику биомаркеры [67, 71, 175]. Большинство биомаркеров социально значимых заболеваний, в частности онкозаболеваний, обнаруживаются на относительно поздних стадиях развития патологии, что является неприемлемым параметром для их использования для диагностических и прогностических целей. Биомаркеры «ранних биологических эффектов», к которым относится окислительный стресс, могут быть использованы для оценки состояния организма, предшествующего развитию той или иной патологии [104, 107, 162]. Выявление общих закономерностей в развитии таких актуальных заболеваний как диабет и онкологические заболевания поможет применить полученные знания для разработки новых методов ранней диагностики.

Цель и задачи исследования. Цель работы - изучение экспрессионной регуляции митохондриального метаболизма в условиях окислительного стресса при экспериментальном диабете и светлоклеточном почечно-клеточном раке.

Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести полнотранскриптомный анализ экспрессии клеток поджелудочной железы крыс *Rattus norvegicus* при экспериментальном диабете и клеток почек человека при светлоклеточном ПКР.

2. Оценить функциональное состояние системы защиты от АФК клеток поджелудочной железы крыс при диабете путем изучения экспрессии избранных генов-мишеней методом qPCR.

3. Выявить влияние предварительной терапии митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 на профиль экспрессии генов окислительного метаболизма при развитии экспериментального диабета у крыс.

4. Изучить эффект предварительной терапии антиоксидантом SkQ1 на характер развития гипергликемии при аллоксановом диабете.

5. Оценить респираторные характеристики изолированных митохондрий печени крыс в ответ на пре-терапию диабета антиоксидантом SkQ1.

6. Изучить продукцию АФК митохондриями различных тканей при аллоксановом диабете и в условиях предварительной антиоксидантной терапии.

7. С помощью методов биоинформатики установить связь данных полнотранскриптомного анализа экспрессии генов с изменением активности метаболических путей при светлоклеточном ПКР.

8. Выявить биохимические метаболические пути, характеризующиеся наибольшей степенью изменения активности их компонентов, при светлоклеточном ПКР и проанализировать возможные механизмы регуляции.

Научная новизна. Проведен полнотранскриптомный анализ генной экспрессии при ПКР на российской популяции.

Показано, что при светлоклеточном ПКР явно подавляется экспрессия дыхательных путей, что приводит к дисфункции митохондрий и почек в целом.

Изучено влияние митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на развитие диабета 1 типа. Показано, что он снижает уровень

экспрессии маркерных генов практически до уровня нормы. Продемонстрированы протекторные свойства антиоксиданта на изолированных митохондриях.

Выявлены общие закономерности в развитии диабета 1 типа и светлоклеточной почечно-клеточной карциномы, основанные на нарушении окислительного метаболизма.

Практическая значимость. Изучение молекулярно-генетических и физиолого-биохимических основ окислительного стресса, который служит отправной точкой для развития многих заболеваний, позволит выявить системные взаимосвязи, способствующие совершенствованию уже имеющихся и развитию инновационных методов лечения и диагностики. Принципиально важным элементом в диагностике социально значимых заболеваний является своевременность. Около половины всех случаев онкологических заболеваний диагностируются на поздних стадиях. В этой связи особую актуальность приобретают биомаркеры ранних патологических состояний, к которым относится окислительный стресс.

Данные о протекторной роли антиоксиданта SkQ1 при диабете 1 типа могут способствовать дальнейшему развитию спектра производимых фармакологических препаратов на основе SkQ1.

Материалы данной работы используются в учебном процессе на биолого-почвенном факультете Воронежского госуниверситета при чтении лекций, спецкурсов и для проведения лабораторных практикумов.

Положения, выносимые на защиту.

1. В основе развития диабета 1 типа и светлоклеточной почечно-клеточной карциномы лежит комплексное нарушение окислительного метаболизма.
2. Воздействие аллоксана приводит к угнетению антиоксидантной защиты β -клеток поджелудочной железы.

3. Пре-терапия диабета 1 типа антиоксидантом SkQ1 снижает уровень гипергликемии и демонстрирует эффективность на уровне экспрессии маркерных генов.
4. Диабет 1 типа и светлоклеточный ПКР характеризуются сходным профилем дифференциальной экспрессии генов и имеют общую метаболическую основу, выражающуюся в дерегуляции процессов митохондриального окислительного фосфорилирования и энергетического гомеостаза.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на международных, региональных и университетских конференциях. Они были представлены на 1-й международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2010), 22-й международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2015» (Москва, 2015).

Публикации. Основные результаты настоящей диссертационной работы изложены в 19 публикациях – 15 статьях и 4 тезисах.

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы (187 источников) и приложения. Иллюстрационный материал включает 21 рисунок, 9 таблиц.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Митохондрии и окислительный стресс

1.1.1. Физиология и метаболизм митохондрий

Согласно эндосимбиотической теории Маргулис, митохондрии возникли в результате примитивного симбиоза предков Архей и прокариотического вида α -протеобактерий [150]. Однако в процессе эволюции митохондрии утратили способность синтезировать большинство белков, кодируемых примитивной бактериальной ДНК, и сохранили только небольшую замкнутую полицистронную 16 Кб молекулу мтДНК, контролирующую синтез примерно 67 белков, включающих 13 полипептидов электрон-транспортной цепи, в то время как остальные бактериальные гены перешли в ядерный геном. По ходу эволюции митохондрии сохранили некоторые бактериальные черты, но и приобрели также ряд совершенно новых, таких как комплексная регуляция образования энергии, контроль клеточной пролиферации и программируемой клеточной смерти. Кроме того, митохондрии стали центральными модуляторами самого существования клеток, вместив в себя различные сигнальные пути [3, 56].

Большая часть энергии клетки производится митохондриями. Основная их функция состоит в том, чтобы превращать продукты метаболизма углеводов, белков и жирных кислот в CO_2 и воду, используя ключевые ферменты ЭТЦ: NADH-дегидрогеназу (Комплекс I), сукцинатдегидрогеназный комплекс (Комплекс II), цитохром bc₁ (Комплекс III), цитохром c оксидазу (Комплекс IV). Электроны от NADH + H⁺ и FADH₂ (образовавшиеся в результате окисления ацетил-Ко А в ЦТК) переносятся на Комплексы I и II ЭТЦ. Электроны эти передаются по ЭТЦ и в результате принимаются кислородом ($1/2 \text{O}_2$), чтобы образовать молекулу H₂O [6, 119, 149]. По мере того, как электроны передаются по цепи, высвобождается

энергия, которая используется для закачки протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану (рис.1).

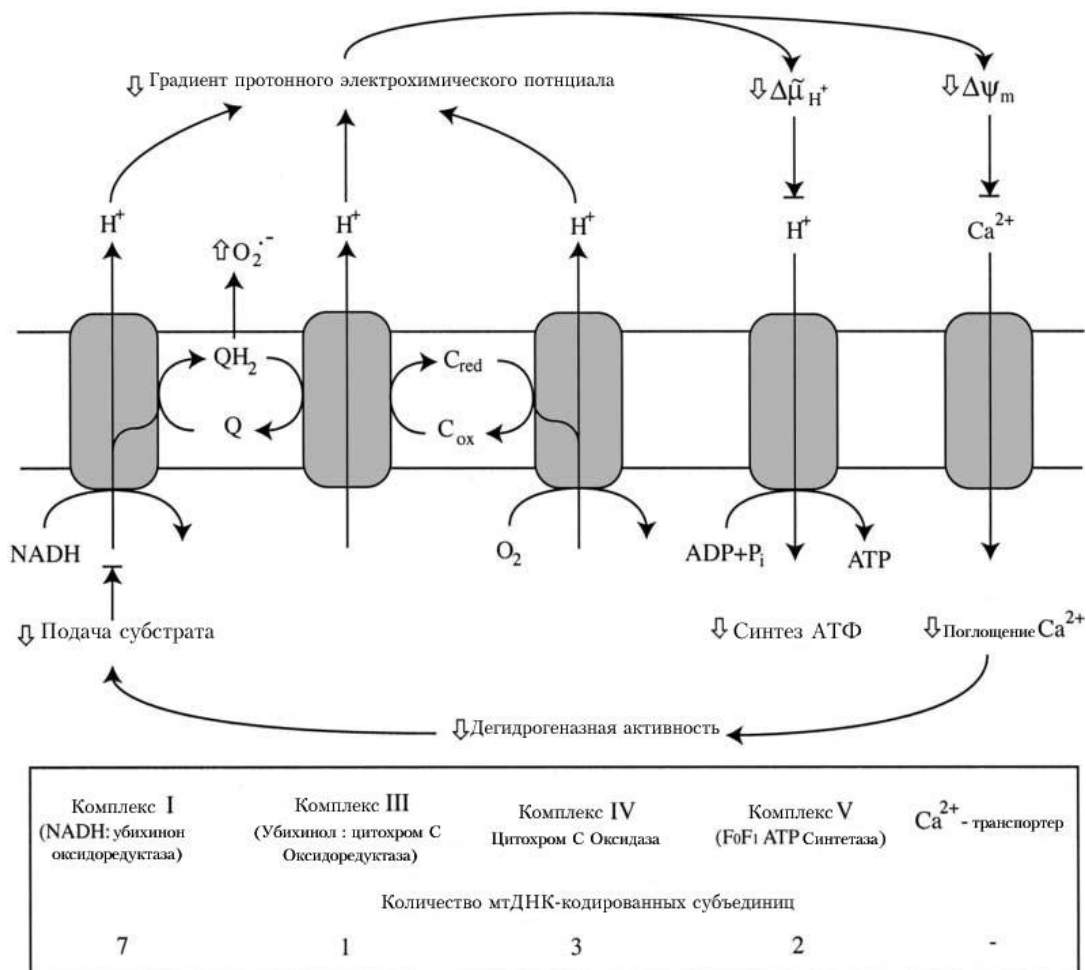


Рис. 1. Электрон-транспортная цепь митохондрий. Q – убихинон; QH₂ – убихинол; C_{ox} – окисленный феррицитохром с; C_{red} – восстановленный феррицитохром с; $\Delta\mu_{H^+}$ - движущая сила протона; $\Delta\psi_m$ – потенциал митохондриальной мембраны).

Комплекс I (NADH-убихинон оксидоредуктаза, КФ 1.6.5.3), наибольший по размеру среди комплексов ЭТЦ, состоит из двух доменов, имеющих форму латинской L: один гидрофобный домен располагается внутри и ориентирован параллельно мембране, в то время как гидрофильная «рука» проникает в митохондриальный матрикс. Этот комплекс переносит два электрона от NADH, образуемого в результате работы ЦТК, в матрикс на коэнзим Q в

мембране посредством FMN и семи железосерных кластеров. FMN способен разделять одновременный перенос двух электронов с NADH₂ и протона, перемещая H⁺ в два отдельных одноэлектронных этапа, что необходимо для транспорта электронов через железосерные кластеры. Кроме того этот комплекс является главным сайтом генерации супероксид-анион радикала в качестве побочного продукта [55, 73, 112, 159]. Комплекс II (сукцинат дегидрогеназа, КФ 1.3.5.1) окисляет сукцинат до фумарата и восстанавливает убихинон (Q) до QH₂ в пределах мембраны. Перенос электронов от FADH₂ осуществляется изначально с помощью кофактора FAD, а затем через последовательность из трех железосерных кластеров. В первом из них [2Fe₂S] один из атомов Fe связан с кислородом аспартата. Вторым и третьим – кластеры [4Fe₄S] и [3Fe₄S]. Затем электроны передаются через железо цитохрома b₅₆₀ на убихинон. Комплекс III (убихинол цитохром с редуктаза, КФ 1.10.2.2) катализирует перенос электронов от сукцината посредством FADH₂ – и NADH-связанных дегидрогеназ на цитохром с, подвижный переносчик электронов, локализованный на внешней поверхности внутренней митохондриальной мембраны, переносящий один электрон за раз от комплекса III на комплекс IV. Комплекс IV (цитохром с оксидаза (COX), КФ 1.9.3.1), локализованный внутри митохондриальной внутренней мембраны, выступает конечным участком ЭТЦ у всех аэробных организмов. Эта реакция сопряжена с переносом четырех протонов через внутреннюю мембрану митохондрий, стимулируя синтез АТФ посредством F₀-F₁ АТФ синтазы. В каждой из двух половин COX располагаются три металлических сайта, участвующих в транспорте электронов: биметаллический Cu_A, монометаллический цитохром a и биметаллический цитохром a₃/Cu_B. Также в процесс закачки протонов могут быть вовлечены нередокс ионы Mg²⁺ и Zn²⁺ [25]. Цитохром с инициирует электронный поток через COX путем доставки одного электрона за раз на Cu_A, расположенный снаружи мембраны. Электроны идут далее от Cu_A через цитохром a на сайт a₃/Cu_B, который располагается там, где связывается кислород, а затем восстанавливается до

воды. Благодаря четырем одноэлектронным редокс центрам (CuA, цитохром a, CuB и цитохром a₃), фермент способен удерживать четыре электрона, необходимые для полного восстановления одной молекулы O₂. Комплекс V (митохондриальная F₀-F₁ АТФ синтаза) – мембранный белковый комплекс, состоящий из каталитического сектора F₁, мембранного сектора F₀ и длинного «стебля», соединяющего F₁ и F₀. Данный комплекс сопрягает градиент протонов по разные стороны внутренней митохондриальной мембраны с синтезом АТФ. Субъединичный состав сектора F₁ и его кратная трех вращательная симметрия, предполагающая наличие трех α и трех β субъединиц, позволили пролить свет на механизмы синтеза и гидролиза АТФ. Однако после того, как в результате исследования очищенного комплекса F₀F₁ АТФ синтазы дрожжей обнаружилось, что кристалл содержит 10 субъединиц вместо 9 или 12, как считалось традиционно (что удовлетворяло соображениям симметрии), пришлось пересмотреть устоявшееся соотношение H⁺/АТФ, равное 3 или 4. Принцип несовпадения симметрии может быть общим принципом построения всех молекулярных роторных моторных систем, так как подобное явление было обнаружено и в других системах [150]. Имеются две главные области дыхательной цепи, где генерируются АФК: одна – это Комплекс I, другая – Комплекс III. При нормальных физиологических условиях одна митохондрия печени крыс может генерировать приблизительно 3¹⁰⁷ супероксид анион-радикалов в сутки [11]. Наибольший вклад в производство супероксида вносит Комплекс I, который представляет собой первый локальный участок окислительного фосфорилирования.

1.1.2. Активные формы кислорода

Термин «активные формы кислорода» включает в себя все нестабильные метаболиты молекулярного кислорода, обладающие большей реактивностью, чем O₂, такие как супероксид радикал O₂^{•-}, гидроксил радикал HO[•] и

нерадикальные молекулы, такие как перекись водорода H_2O_2 . Эти виды АФК образуются в качестве побочного продукта нормального аэробного метаболизма, но их уровень увеличивается в условиях стресса [11, 55, 73, 112, 159]. АФК состоят из свободных радикалов кислорода и других химических соединений, которые включают супероксидные свободные радикалы, перекись водорода, синглетный кислород, оксид азота и пероксинитрит. Большинство форм в небольшом количестве образуются при нормальных физиологических условиях и улавливаются эндогенными антиоксидантными системами, которые включают супероксиддисмутазу (СОД), глутатионпероксидазу, каталазу и небольшие молекулы, такие как витамины С и Е. Наиболее часто образующейся формой АФК является супероксид-анион радикал. Его генерация происходит вследствие работы ксантиноксидазы, NADPH-оксидаз и цитохрома P450. Супероксид образует перекись водорода в реакции Хабера-Вайсса в присутствии железа с помощью марганец-зависимой СОД или медь-зависимой СОД. В присутствии переходных элементов реакция перекиси с супероксидом приводит к образованию гидроксильного радикала, наиболее активной формой АФК. По-другому гидроксильный радикал может образовываться вследствие взаимодействия супероксид-радикала и NO [122]. Оксид азота взаимодействует с супероксид-радикалом и образует пероксинитрит, что в дальнейшем может привести к генерации пероксинитритной кислоты. Гидроксил-радикал образуется в результате спонтанного разложения пероксинитритовой кислоты. Оксид азота сам по себе и пероксинитрит также позиционируются как активные свободные радикалы кислорода.

В результате работы митохондриальной дыхательной цепи 0,2-2% всего кислорода, потребляемого клетками, высвобождается в виде активных форм кислорода (АФК) [7]. Образованные митохондриями и долгое время традиционно считавшиеся лишь вредоносными побочными продуктами окислительного фосфорилирования АФК выполняют различные функции в клетке – регуляция программируемой клеточной смерти, дифференциация

адипоцитов, участие в процессе высвобождения инсулина и реализации его функций, сигнальные функции в условиях гипоксии, комплекс механизмов контроля метаболизма митохондрий и другие [105].

Среди последствий, которые имеет продукция АФК для клетки также перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот в составе митохондриальной мембраны; повреждение белков путем прямого окисления аминокислот свободными радикалами, разрыва пептидного остова молекулы, реакций с продуктами ПОЛ, с АФА и прямого взаимодействия АФК с металлическими кофакторами; окислительное повреждение ядерной и митохондриальной ДНК [138].

Основной вклад в общий уровень генерации активных форм кислорода в клетке вносит продукция супероксида, который имеет семь основных сайтов образования в митохондриях Млекопитающих [11]. Это сайты связывания убихинона в комплексах I и III ЭТЦ (IQ и IIIQ0), глицерол 3-фосфат дегидрогеназа, флавин в комплексе I (сайт IF), электрон-транспортный флавопротеин: Q оксидоредуктаза (ETFQOR) процесса β -окисления жирных кислот, пируват- и 2-оксоглутарат дегидрогеназы.

Когда мембранный потенциал на внутренней митохондриальной мембране достаточно высок для того, чтобы произошла индукция образования активных форм кислорода, фермент супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1) превращает супероксид в перекись водорода по реакции $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Эта реакция позволяет каталазе, глутатионпероксидазе и пероксиредоксинам осуществлять разложение перекиси водорода на воду и кислород, $H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$. Существует две изоформы СОД, различающихся по своей компартментной принадлежности [61]. Медь-цинковая изоформа (ZnSOD, SOD1) и марганцевая супероксиддисмутаза (MnSOD, SOD2). SOD1 отвечает за утилизацию супероксида в цитозоле и внеклеточном матриксе, в то время как энзиматическая активность SOD2 обнаруживается в митохондриальном матриксе.

Функции ферментов антиоксидантной защиты клетки включают не только прямую нейтрализацию АФК, и тем самым снижение риска развития окислительного стресса. Мутация G93A-SOD1 в гене медно-цинковой супероксиддисмутазы в эксперименте на мышах имеет нейротоксический эффект, обуславливающий развитие амиотрофического латерального синдрома (ALS) и ассоциирована с ухудшением способности митохондрий к потреблению Ca^{2+} , синтезу АТФ, а также снижением целостности митохондрий [57].

Активные формы кислорода и состояние окислительного стресса принимают участие в регуляции факторов транскрипции, вовлеченных в процессы биогенеза митохондрий. Окислительные повреждения, вызванные главным образом воздействием на клеточные культуры перекисью водорода, увеличивают экспрессию факторов транскрипции NRF-1 и NRF-2, а также PGC-1 α и PGC-1 β , которые в свою очередь регулируют экспрессию генов ферментов, вовлеченных в антиоксидантную защиту клетки, таких как каталаза и супероксиддисмутазы [178].

Другим важным источником АФК, где они образуются не как побочный продукт, выступают NADPH оксидазы, которые присутствуют в самых разных клетках, особенно в специализированных фагоцитах и клетках эндотелия [112].

1.2. Патологии и окислительный стресс

В условиях чрезмерного потребления энергии (относительно энергетических потребностей организма) и высокой степени сопряжения митохондрий комплексы ЭТЦ насыщаются электронами, и протон-движущая сила достигает максимального значения [12, 60, 138]. Дыхательная цепь замедляется, и электроны высвобождаются напрямую на кислород, чтобы образовать O_2^- . Со временем повышенная генерация активных форм

кислорода может превзойти антиоксидантные возможности митохондрий, таким образом повреждая клетки или вызывая их смерть.

Дисфункция митохондрий ввиду тех или иных причин способна стать причиной развития определенной патологии. Митохондриальная болезнь – это хроническая потеря клеткой энергии, ситуация, когда неспособность адекватно ответить на энергетический запрос приводит к развитию клинического фенотипа [27]. Клинический спектр митохондриальных заболеваний широк и включает инсульт, ретинопатию, кардиомиопатию и диабет (рис.2), однако почти всегда в патологические процессы вовлечены ткани с высокими энергетическими потребностями, такие как центральная нервная система, сердце.

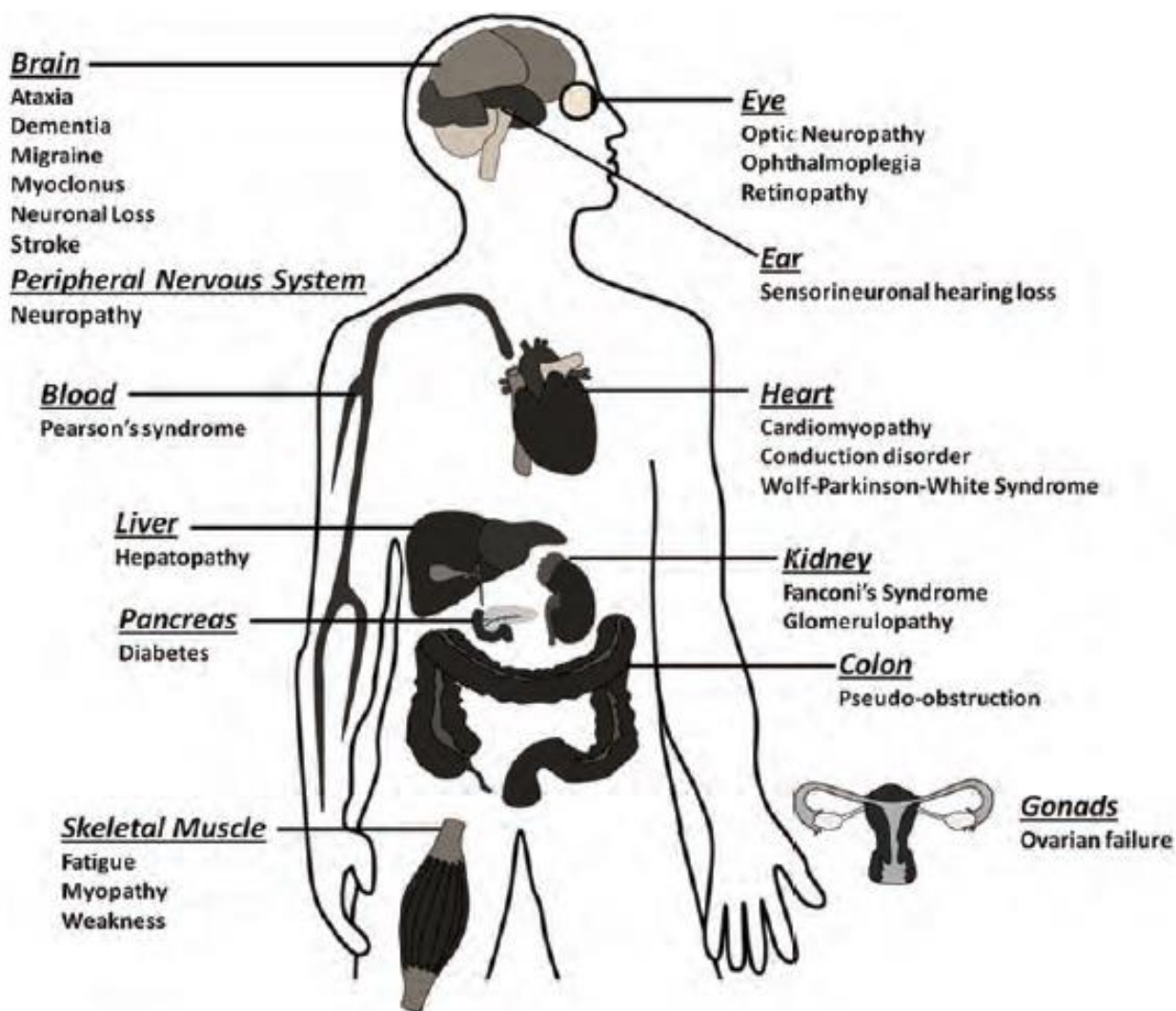


Рис. 2. Разнообразие митохондриальных заболеваний.

В настоящее время связь между состоянием окислительного стресса и развитием какого-либо заболевания считается очевидной. Rahal с сотрудниками приводят ряд доказательств такого взаимоотношения, лежащие в области геномики и протеомики [136]. Метилирование нуклеиновых кислот, связывание белками ДНК, образование и связывание гистоновых белков, репарация и модификации, опосредуемые белками, чувствительны к свободным радикалам, образующимся в процессе окислительного стресса. Таким образом, возможно нарушение эпигенетических процессов, участвующих, к примеру, в регуляции экспрессии генов-супрессоров опухолей.

Имеется целый ряд клеточных механизмов регуляции баланса проокислительной и антиокислительной активностей – от наиболее общего с помощью ферментативной регуляции образования АФК посредством супероксиддисмутаза и других антиоксидантных ферментов до более специфичных.

Окислительный стресс, нарушающий работу митохондрий на многих уровнях и выявляемый по генерации перекиси водорода или делеции митохондриальной супероксиддисмутаза SOD2 в экспериментах Нео с сотрудниками вызывал переход белка Vms1 из цитоплазмы в митохондрии, поддерживая нормальное функционирование системы убиквитин-зависимой деградации белков, что необходимо для сохранения жизнеспособности митохондрий, клеток и организма в целом [68]. Клетки, испытывающие недостаток в Vms1, характеризуются прогрессивной митохондриальной недостаточностью, гиперчувствительностью к окислительному стрессу и сниженной продолжительностью жизни.

Гиперпродукция супероксида, индуцированная гипергликемией индуцирует клеточные реакции, которые запускают ряд метаболических путей, участвующих в дисфункции эндотелия и способствующих прогрессивному развитию микро- и макрососудистых осложнений и полиорганных повреждений. Ингибирование образования митохондриального окислителя и/или молекулярных повреждений, возникающих вследствие его воздействия, может обеспечить потенциальный подход для профилактики диабетических сосудистых осложнений.

Хотя хорошо известно, что контроль гликемии - основа профилактики диабетических осложнений, нет никаких сомнений в том, что должны также предприниматься профилактические меры, направленные на другие факторы риска. Терапевтическая стратегия для диабетических сосудистых осложнений должна заключаться в модуляции поврежденных путей. Таким образом, терапевтические стратегии, направленные на ограничение продукции митохондриальной радикалов во время гипергликемии и противодействие их

повреждающему эффекту может быть полезным дополнением к обычным видам терапии, предназначенная для нормализации уровня глюкозы в крови.

1.2.1. Диабет

Инсулиновая резистентность может быть следствием митохондриальной дисфункции, повышенного поступления липидов вследствие высокоэнергетической диеты или повышенного липолиза, увеличения количества липидов, запасаемых клетками тканей, которые обычно содержат минимальные количества липидов (мышцы и печень) [86]. Состояния повышенной доступности липидов вызывают инсулиновую резистентность путем образования внутриклеточных липидных метаболитов (ацил-СоА, диацилглицерол, керамиды), которые стимулируют воспалительные пути, интерферируют с сигнальными функциями инсулина.

Доказательство важной роли митохондрий в процессе секреции инсулина и развитии диабета следует из примера митохондриального диабета, наследуемого по материнской линии диабета и глухоты (*maternally inherited diabetes and deafness (MIDD)*). MIDD – наследственное заболевание, составляющее примерно 1% от всех случаев диабета. Этиология MIDD состоит в ухудшении функционирования β -клеток, вызванном главным образом мутацией A3243G в гене *tRNA^{Leu}* мтДНК [179]. Пациенты, несущие эту мутацию имеют почти стопроцентную вероятность развития диабета с возрастом, что ассоциировано с дисфункцией панкреатических β -клеток и снижением интенсивности обеих фаз секреции инсулина.

Сахарный диабет – комплексное метаболическое заболевание, характеризующееся повышенным уровнем глюкозы в крови вследствие недостаточной продукции инсулина или развития резистентности к инсулину. Все клинические типы диабета имеют ряд микрососудистых осложнений, таких как ретинопатия (в экстремальном проявлении способная привести к слепоте), нефропатия (может привести к конечной

стадии болезни почек и впоследствии к полному отказу почки) и нейропатия (может привести к ампутации); макрососудистые осложнения при диабете включают в себя болезнь коронарных артерий, атеросклероз, гипертензию и инфаркт. Среди ключевых факторов развития диабетических осложнений выделяют гипергликемию, резистентность к инсулину, дислипидемию, окислительный стресс. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе высокой частоты возникновения осложнений, не полностью изучены.

Для диагностики диабета 2 типа (наиболее распространенной его разновидности) возможно использовать метод qPCR для определения в сыворотке крови молекулы miR-126, нового биомаркера данной патологии, валидность которого недавно была протестирована на сравнительно большой выборке [102].

Диабет обычно бывает ассоциирован с ожирением, и ряд молекул микроРНК в адипоцитах, экзосомах сыворотки и в плазме крови демонстрируют изменение профиля экспрессии в условиях развития патологии. Первая попытка профилирования микроРНК, обнаруживаемых в сыворотке крови, для диагностики ожирения была предпринята Pescador с сотрудниками. Они установили и обосновали перспективу использования miR-15b, miR-138 и miR-376a в качестве потенциальных диагностических биомаркеров ожирения и диабета 2 типа [131].

В развитии диабета и его осложнений важную роль играет окислительный стресс. Поэтому особый интерес представляет изучения факторов транскрипции и других механизмов, активируемых окислительным стрессом, которые влияют на дифференциальную экспрессию микроРНК при диабете. Показано, например, что окислительный стресс усиливает продукцию активных форм кислорода (АФК) посредством уменьшения содержания микроРНК miR-205, мишенью которой служит пролилгидролаза 1 (PHD1), и сопутствующего этому снижению экспрессии генов гемоксигеназы-1 и супероксиддисмутаза 1 и 2 [117]. Каскады miR-192/miR-216a/217 активируют Akt и ингибируют супероксиддисмутаза 2 (SOD2) в

почках мышей. SOD1 и SOD2 являются мишенями для miR-377. В экспериментах с охратококсином А (ОТА) наблюдалась индукция miR-200c и miR-132, что запускало развитие окислительного стресса, так как мишенями этих микроРНК являются редокс-чувствительный фактор транскрипции Nrf2 и HO-1, соответственно [158]. Таким образом, HO-1, SOD1, SOD2 и NOX4 представляются главными мишенями ключевых микроРНК, регулируемых состоянием диабета, и которые таким образом вносят вклад в развитие окислительного стресса (усиленной продукции АФК).

В условиях невыполнения инсулином своих функций вследствие резистентности клеток к нему, отсутствия самой секреции гормона (что во многом является находящимся в фокусе настоящей работы) возникает состояние гипергликемии, которое является первичной причиной повреждения тканей при диабете. При гипергликемии больше глюкозы окисляется через ЦТК. Это заставляет больше восстановительных эквивалентов (доноров электронов) включаться в работу ЭТЦ, таким образом приводя к повышению генерации АФК вследствие увеличения соотношения NADH/NAD⁺ [16]. Точно так же при инсулинорезистентности наблюдается увеличение потока свободных жирных кислот от адипоцитов к клеткам эндотелия сосудов, что может привести к повышению уровня окисления жирных кислот митохондриями; так как β -окисление жирных кислот и окисление ацетил-СоА из ЦТК генерируют одни и те же доноры электронов (NADH и FADH₂), образуемые вследствие окисления глюкозы, повышение окисления жирных кислот может вызвать гиперпродукцию митохондриальных АФК по механизму, характерному и для гипергликемии [120]. Хронически высокий уровень глюкозы, а также высокие концентрации жирных кислот могут вызвать повреждение различных типов клеток с помощью различных механизмов («глюколипотоксичность»), но окислительный стресс может быть общим во всех случаях связующим звеном в дисфункции клеток. Инсулинорезистентность, как предполагается, предшествует и предвосхищает развитие ИНЗСД в большинстве тканей и органов, включая

мышцы, жировую ткань и печень. Стимулируемый инсулином синтез гликогена в мышцах – это главный метаболический путь для распределения избыточной глюкозы у здоровых взрослых людей после приема пищи [147], и, таким образом, направления глюкозы больше на путь анаболизма, чем на путь катаболизма. Повышенная концентрация свободных жирных кислот (СЖК) в плазме приводит к аккумуляции липидов внутри миоцитов человека, и это играет важную роль в инициации и развитии инсулинорезистентности и гибели панкреатических β -клеток [137]. В 1963 году впервые было показано, что жирные кислоты окисляются изолированными сердечной и скелетной мускулатурой, таким образом, ингибируя утилизацию глюкозы [111]. Усиленное окисление СЖК приводило к увеличению соотношения НАДН/НАД⁺ внутри митохондрий, уменьшая, таким образом, активность пируватдегидрогеназы и, следовательно, интенсивность окисления глюкозы. Таким образом, усиленный метаболизм СЖК может также привести к усиленной генерации АФК. Есть данные, что глюкоза или СЖК инициируют образование АФК в мышцах, адипоцитах, панкреатических β -клетках и других клетках [122]. Интересно, что по сравнению с другими клетками β -клетки могут быть больше подвержены окислительным повреждениям, сопряженными с повышенной чувствительностью к апоптозу. Этот высокий риск может быть обусловлен:

- Избыточной продукцией митохондриальных АФК;
- Генерацией АФК вследствие повышенной активности НАДФН-оксидазы в β -клетках;
- Сбоем в антиоксидантной защите.

По отношению к диабету 2-го типа, дисфункция β -клеток и связанная с этим депрессия секреции инсулина должны быть очевидны еще до развития гипергликемии [151].

Не всегда митохондриальная дисфункция при диабете связана с гиперпродукцией митохондриальных АФК. Чаудери и Жеребицкая на стрептозотоциновой модели диабета показали, что генерация АФК

митохондриями нейронального перикария на комбинации пирувата и малата в присутствии антимицина А была значительно ниже, чем в контроле, что указывает на возможную разницу функционирования митохондрий аксона и перикария или на то, что окислительный стресс в аксонах имеет иное происхождение [29].

Митохондриальный ответ на развитие диабета по-видимому имеет специфические различия в зависимости от типа наблюдаемой патологии. Так, дисфункция митохондрий сердца в условиях инсулин-зависимого диабета имеет различается от таковой при инсулинрезистентном диабете 2 типа. В эксперимента на мышцах линии Akita, воспроизводящих состояние диабета 1 типа к 5-6 неделе жизни, будучи к этому моменту уже в состоянии глубокой гипергликемии, показано, что несмотря на увеличение содержания UCP3 митохондрии сердца не демонстрировали разобщение, индуцированное жирными кислотами, что означает возможное различие молекулярных механизмов развития митохондриальной дисфункции между диабетом 1 и 2 типа [17]. Тот факт, что увеличение содержания UCP3 не обязательно приводило к митохондриальному разобщению, поддерживает гипотезу, что индуцируемое жирными кислотами митохондриальное разобщение в диабетическом сердце требует сопутствующего увеличения количества АФК или образования пероксидов липидов [155].

Разобщающие белки (uncoupling proteins, UCPs) – семейство митохондриальных белков-переносчиков, обладающих тканеспецифичностью. Функции гомологов UCP1 не полностью установлены [94].

По меньшей мере два типа митохондриальных переносчиков, активируемых небольшими молекулами, способны индуцировать ингибитор-зависимую протонную проводимость. К первому типу относятся разобщающие белки UCPs, о которых шла речь ранее. Второй тип – транспортер адениновых нуклеотидов ANT (АТФ/АДФ-переносчик), который осуществляет обмен АДФ на АТФ через внутреннюю

митохондриальную мембрану [63, 130]. Причем будучи катализатором базового ЖК-нечувствительного протонного тока в митохондриях, транспортер может являться также модулятором этого процесса. По данным Бранда с сотрудниками количество ANT влияет на протонную проводимость в митохондриях дрожжей и высших организмов [13].

Митохондриальные разобщающие белки UCPs усиливают протонный ток через внутреннюю митохондриальную мембрану, таким образом меньшая окислительный стресс путем снижения электрохимического градиента [1, 16, 40, 42, 121, 181]. Эффекты разобщения включают в себя уменьшение продукции АФК, рассеивание энергии в виде тепла, ослабление синтеза АТФ и поступления кальция в митохондриальный матрикс. Разобщение может быть стимулировано высоким содержанием митохондриальных АФК или свободных жирных кислот [23, 31, 72, 110, 127, 139]

UCP2 является очень нестабильным белком. Период полужизни составляет приблизительно 30 минут, что несравнимо меньше, чем у его гомолога, UCP1, для которого этот параметр равен 30 часам [142]. Эта разница может быть индикатором различных биологических функций двух форм анионных переносчиков. Продукция тепла в бурой жировой ткани белком UCP1 - обычно длительный адаптивный феномен, в то время как контроль митохондриальных АФК с помощью UCP2 требует более тонкой регуляции [48, 50, 82, 154].

Говоря о самых распространенных 1 и 2 типах диабета и молекулярных механизмах, обуславливающих развитие патологий, неизбежно возникает вопрос универсальности биохимических изменений в клетках и тканях для всех типов диабета, а также для диабетических состояний представителей разных таксономических групп. В работе Клайна с сотрудниками, исследующей механизмы, лежащие в основе ухудшения стимулируемой глюкозой секреции инсулина (GSIS) у пациентов с сахарным диабетом взрослого типа у молодых 3 типа (MODY-3), предполагается, что активация UCP2 может вносить вклад в развитие дисфункции β -клеток поджелудочной

железы. Измеренные в реальном времени с помощью метода ЯМР с применением радиоактивно меченного фосфора ^{31}P скорости синтеза АТФ показали, что митохондрии линий β -клеток с доминантно-отрицательной мутацией в $\text{HNF-1}\alpha$, ответственном за MODY-3 , были более разобщены и менее эффективны в отношении синтеза АТФ в условиях глюкозостимулируемой секреции инсулина [30].

Аллоксан (2,4,5,6-тетраоксипиримидин) (рис. 3) был впервые описан Брунателли в 1818 г. Велер и Либих ввели название «аллоксан» и установили, что он образуется вследствие окисления мочевой кислоты [mech of all act].

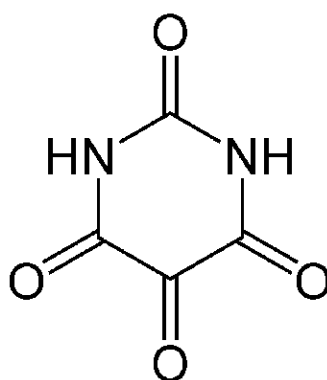


Рис. 3. Структурная формула аллоксана.

В 1943г. Данн с сотрудниками обнаружили, что введение аллоксана крысам и кроликам сопровождается развитием у них диабета, который можно назвать островковым [10]. Он является следствием некроза β -клеток островков Лангерганса и вызываемой таким путём первичной инсулиновой недостаточности. Большим преимуществом такого «химического» диабета является сохранение внешней секреции поджелудочной железы и нормальная продукция её активных начал.

Одно из важнейших свойств, определяющих диабетогенность аллоксана – быстрое его потребление инсулин-секретирующими клетками. Другой аспект его действия – образование активных форм кислорода [164]. Потребление аллоксана также имеет место в печени. Однако печень и другие ткани более устойчивы к активным формам кислорода, чем β -клетки поджелудочной железы, и эта устойчивость защищает их от токсичного

действия аллоксана. Образованию активных форм кислорода предшествует восстановление аллоксана. Т.к. аллоксан проявляет высокое сродство к SH-содержащим компонентам клетки, восстановленный глутатион, цистеин и сульфгидрильные группы белков очень восприимчивы к его действию [163].

В результате восстановления аллоксана образуется диалуровая кислота, которая затем реокисляется, создавая таким образом редокс-цикл для генерации молекул супероксид-радикала (рис. 4)

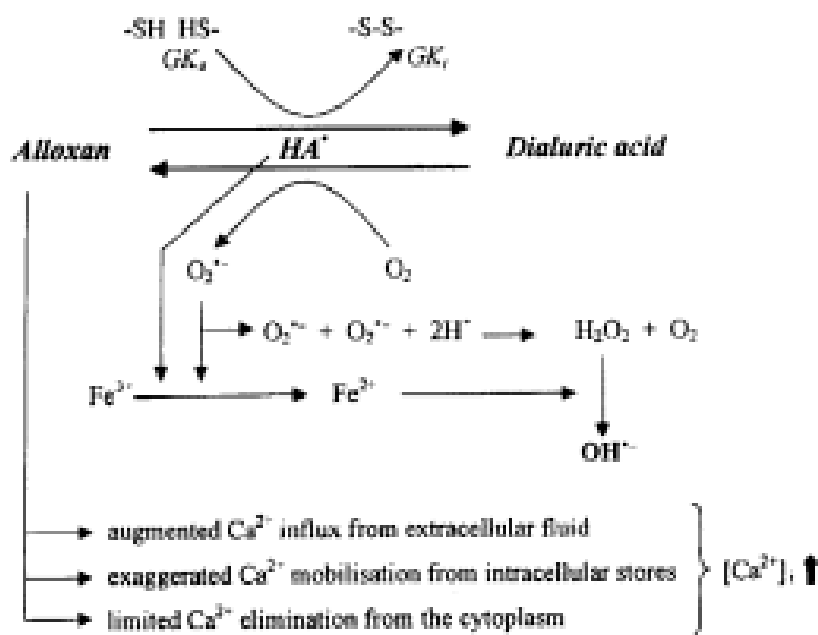


Рис. 4. Механизм генерации активных форм кислорода в β-клетках поджелудочной железы крыс в присутствии аллоксана. GK_a, GK_i – глюкокиназа активная и неактивная, соответственно; HA• – радикалы аллоксана; [Ca²⁺]_i – внутриклеточная концентрация кальция.

Одной из мишеней активных форм кислорода является ДНК панкреатических островков. В β-клетках под воздействием аллоксана происходит фрагментация ДНК. Повреждение ДНК стимулирует поли-АДФ-рибозилирование – процесс, участвующий в механизмах репарации ДНК. Некоторые ингибиторы поли-АДФ-рибозилирования могут частично ограничивать токсичность аллоксана. Однако этот эффект, как предполагается, связан с улавливанием этими веществами свободных

радикалов, а не с прямым влиянием на процесс поли-АДФ-рибозилирования [164]. Супероксид-дисмутаза, каталаза (и неферментативные «ловушки» гидроксильных радикалов, как выяснилось, также способны защищать от токсичного действия аллоксана. Следовательно, химические соединения, обладающие антиоксидантными свойствами, могут уменьшать токсичность аллоксана. Аллоксановый диабет характеризуется комплексом ярко выраженных дегенеративных нарушений в различных органах, в том числе и ЦНС. Молекулярные механизмы патогенетических преобразований при аллоксановом диабете в основном обусловлены глубиной метаболических расстройств липидов различных категорий, главным образом фосфолипидов. Деацилирование последних с повышенной интенсивностью характеризуется выходом значительных количеств полиеновых жирных кислот, активно вовлекающихся в реакции свободнорадикального окисления. Образование при этом высоких концентраций продуктов перекисного окисления рассматривается как одна из главных причин инициации, развития аллоксанового диабета.

Ввиду избыточной генерации АФК при развитии диабета, то идеальная терапевтическая стратегия должна состоять в повышении мощности систем защиты клетки от АФК. В таком случае защита клеток от митохондриальных АФК посредством антиоксидантов должно останавливать или хотя бы замедлять развитие патологий.

На рубеже 1960- 70-х гг. В.П. Скулачев и его коллеги в МГУ совместно с группой профессора Е.М. Либермана в Академии Наук СССР были заняты проверкой справедливости хемиосмотической гипотезы П. Митчелла, постулировавшего наличие разности электрических потенциалов на мембране митохондрий. Результаты этой работы показали, что некоторые соединения - липофильные катионы (например, ионы фосфония), способны адресно проникать в митохондрии, движимые электрическим полем на митохондриальной мембране. В 1974 г. такие соединения были названы известным американским биохимиком Д. Грином "ионами Скулачева".

В.П. Скулачевым был предложен антиоксидант – катионный аналог хинона – SkQ1, составленный из пластохинона, проникающего катиона и деканового линкера. Биохимические исследования полученного антиоксиданта показали, что SkQ1 является мощным антиоксидантом многократного действия. Огромный интерес представляет изучение ультраструктуры клеток и тканей при действии препарата SkQ1, поскольку отличительной особенностью митохондрий является четко выраженная взаимосвязь функционального состояния и ультраструктуры этих органелл [156]. В.П. Скулачев и его коллеги осуществили синтез катионных производных пластохинона (SkQ), содержащих положительно заряженные остатки ацилтрифенилфосфония или родамина, соединенного с пластохиноном посредством деканового или пентанового линкера. Показано, что различные формы SkQ:

- Легко проникают через плоскую бислойную фосфолипидную мембрану, через мембраны митохондрий и внешнюю клеточную мембрану, электрофоретически накапливаются в изолированных митохондриях и митохондриях живых клеток;
- В низких (наномолярных) концентрациях проявляют высокую антиоксидантную активность в водных растворах, в липидных мицеллах, в изолированных митохондриях и в клетках, предотвращают окисление митохондриального кардиолипина под действием радикала ОН.;
- Проявляют прооксидантную активность в области значительно более высоких (микромолярных) концентраций, что обуславливает наличие очень широкого “окна” между про- и антиоксидантными концентрациями (у катионного производного убихинона MitoQ, такое “окно” оказывается значительно меньше благодаря значительно более низкой антиоксидантной и более высокой прооксидантной активности);

- Восстанавливаются дыхательной цепью до SkQH_2 , причём скорость восстановления значительно выше, чем скорость окисления SkQH_2 .

1.2.2. Онкологические заболевания

В 1956 году Отто Варбург опубликовал труд, связывающий метаболизм и рак посредством усиленного аэробного гликолиза (известного также как эффект Варбурга), который отличает раковую ткань от нормальной [37, 140]. Превращение глюкозы в лактат, которое может происходить в нормальных гипоксических клетках, происходит в раковых клетках несмотря на присутствие кислорода, который бы иначе заингибировал гликолиз посредством эффекта Пастера. Поддерживаемый аэробный гликолиз в определенных раковых клетках связан с активацией онкогенов или потерей супрессоров опухолей [38, 153, 167]. Критики эффекта Варбурга изначально спорили, что гликолитический сдвиг при раке происходил из-за гипоксии в опухоли с последующим переключением на анаэробный гликолиз и усиленную продукцию лактата. Так как солидные опухоли часто перерастают свой запас кислорода, анаэробный гликолиз – явление нередкое. Чтобы восстановить кислородный баланс, индуцируются факторы, индуцируемые гипоксией (HIF) [81, 84, 152].

Хотя эффект Варбурга описывает измененный метаболизм раковой клетки, изменения метаболических генов, которые могли бы предоставить прямую генетическую связь с измененным метаболизмом, не были известны до обнаружения мутантных ферментов ЦТК, которые ассоциированы с синдромом семейного рака [54, 140, 160]. Эти мутации вызывают нарушения ЦТК с накоплением фумарата или сукцината, каждый из которых способен ингибировать диоксигеназы или пролил гидролазы, которые опосредуют деградацию белков HIF. Увеличение количества HIF чаще всего является про-онкогенным, но так же следует отметить, что эти кислоты могут воздействовать на диоксигеназы [79, 146].

Вклад интермедиатов ЦТК в канцерогенез многогранен. Мутации в ИДГ выявили связи между мутантным ферментом метаболизма и канцерогенезом. Мутантная ИДГ обладает неоморфной активностью, которая превращает альфа-кетоглутарат в 2-гидроксиглутарат в отличие от активности ИДГ дикого типа, превращающей изоцитрат в альфа-кетоглутарат. Было показано, что 2-гидроксиглутарат ингибирует диоксигеназы, участвующие в деметилировании гистонов и ДНК. Исследование мутаций ИДГ при остром миелолейкозе связало их с подтипом заболевания, которое характеризуется определенным эпигеномом [78, 170, 172, 177].

Нормальные дифференцированные клетки получают энергию главным образом благодаря митохондриальному окислительному фосфорилированию, в то время как нормальные делящиеся и раковые клетки склонные к аэробному гликолизу, менее эффективному процессу генерации АТФ, но способствующему продукции нуклеотидов, аминокислот и липидов [167]. Раковые клетки получают энергию и промежуточные продукты метаболизма, содержащие углерод, в результате гликолиза без накопления АФК, которые способны повреждать ДНК и другие компоненты клеток. Метаболизм глюкозы посредством гликолиза наряду с поступлениями глутамина и глицина обеспечивают клетку NADPH и АТФ. Гликолитический метаболизм глюкозы преобладает в гипоксических условиях. Понимание метаболизма требует знания профилей метаболитов, ферментативной кинетики и взаимосвязей внутриклеточных метаболических потоков. Cascante с сотрудниками идентифицировали метаболические потоки через окислительный и неокислительный пентозофосфатный пути и поступление глюкозы в анаэробный гликолиз и ЦТК [108]. Метаболомное исследование с помощью стабильных изотопов применили для анализа генетической дисрегуляции путем введения пациентам меченой ^{13}C -глюкозы, после чего следовала резекция опухоли. Анализ метаболомики с использованием ^{13}C проводили с помощью методов ядерного магнитного резонанса и газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Оказалось, что лактат, аланин,

сукцинат, глутамат, аспаргат и цитрат в опухолях были богаты меченым углеродом ^{13}C , указывая на активность гликолиза и ЦТК.

Разобщение гликолиза от окислительного фосфорилирования в ЦТК восполняет энергетические потребности и способствует биосинтезу клеточных компонентов [37]. При гликолизе шестиуглеродный сахар глюкоза окисляется и разделяется на 2 молекулы пирувата и 2 молекулы АТФ. Пируват далее метаболизируется в ацетил-КоА, этанол или лактат. В нормальных условиях, в присутствии кислорода, пируват превращается в ацетил-КоА и далее через ЦТК и окислительное фосфорилирование – в 18 молекул АТФ. Глутамин является важным опухолевым нутриентом, который вносит вклад почти в каждую метаболическую функцию, которая необходима делящейся опухолевой клетке. Глутамин участвует в биоэнергетике, защите от окислительного стресса, а также в процессах биосинтеза предшественников макромолекул. Онкопротеин мус регулирует поступление глутамина и его деградацию [166]. Терапевтические стратегии, направленные на метаболизм глюкозы, могут селективно убивать раковые клетки. Для поддержания высокого уровня метаболизма глюкозы требуются различные гликолитические ферменты. Транскриптомные, протеомные, функциональные и структурные характеристики митохондрий раковой клетки демонстрируют ухудшение биогенеза и активности органелл. Биоэнергетика рака описывается соотношением окислительного фосфорилирования и гликолиза, которое отражает метаболическую активность и может коррелировать с ответом на химиотерапию [185]. Некоторые человеческие карциномы гиперэкспрессируют ингибирующий фактор 1 митохондриальной АТФазы (IF1), который блокирует активность H^+ -АТФазы и способствует адаптации метаболизма к аэробному гликолизу. Ур-регуляция IF1 при раке толстого кишечника запускает гиперполяризацию митохондрий и способствует пролиферации [148].

Раковые клетки устойчивы к митохондриальному апоптозу возможно благодаря усилению гликолиза, накоплению мутаций в митохондриальном

геноме, переключению от дыхания к гликолизу или метаболическому перепрограммированию вследствие возникновения мутантных фумарат гидратазы и сукцинат дегидрогеназы [101]. В митохондриях опухолевой клетки окислительный метаболизм углерода, источником которого являются глюкоза или глутамин, производит цитрат и ацетил-КоА для синтеза липидов. Опухолевые клетки с дефектными митохондриями используют глутамин-зависимое восстановительное карбоксилирование посредством митохондриальной и цитоплазматической NADP/NADPH-зависимой изоцитрат дегидрогеназы (ИДГ) как главные путь образования цитрата. Метаболизм цитрата, полученного из глутамина, поставляет ацетил-КоА для синтеза липидов и четырехуглеродные промежуточные продукты, необходимые для производства метаболитов ЦТК. Глутамин-зависимый путь является доминирующим метаболическим режимом в клетках злокачественных опухолей с мутациями в Комплексе I или Комплексе III ЭТЦ и при почечно-клеточном раке (ПКР) с мутантной ФГ. Глутамин-зависимый путь обращает вспять многие канонические реакции ЦТК, поддерживает рост клеток опухоли и объясняет продукцию промежуточных продуктов ЦТК клетками, функции митохондрий в которых нарушены [160]. Таким образом, гликолиз и окислительное фосфорилирование контролируются на разных уровнях, предоставляя клетке механистическую стратегию для адаптации метаболизма к стрессовым условиям.

ПКР представляет 2% от всех типов рака и примерно 5% всех эпителиальных карцином [51, 93]. Общий прогноз выживаемости пациентов неблагоприятный. Почечно-клеточный рак (ПКР) является наиболее распространенным солидным новообразованием в почках – на него приходится около 90% всех злокачественных опухолей почек. Существуют различные типы ПКР со специфическими патогистологическими и генетическими характеристиками. Частота заболеваемости среди мужчин в 1,5 раза выше, чем среди женского населения. Пик заболеваемости приходится на возрастной промежуток 60–70 лет [88]. Этиологические

факторы включают такие составляющие образа жизни, как курение, ожирение и повышенное давление. Наличие рака почки в анамнезе у родственников первой степени также ассоциируется с повышенным риском развития ПКР. Анализ причинно-следственных связей между образом жизни и факторами окружающей среды с прогрессией ПКР выявило несколько факторов риска. Сильнейшая ассоциация была найдена с курением сигарет; относительный риск развития ПКР у «постоянно курящих» по сравнению с «не курящими» составляет 1.38 [19]. Курение сигарет увеличивает риск развития ПКР посредством хронической тканевой гипоксии, воздействия окиси углерода и повреждений ДНК в тканях, индуцированных специфическими для табака N-нитрозаминами. Ожирение является важным фактором риска развития ПКР. Биологические доказательства связывают изменения гена *Vhl* в жировой ткани с развитием светлоклеточного ПКР посредством ангиогенных факторов и воспалительных цитокинов, адипокинов, высвобождаемых из адипоцитов и создающих предракое микроокружение [129]. Фактором риска развития ПКР также является гипертензия [28]. Точные механизмы, связывающие гипертензию с ПКР, остаются неясными, однако предполагается, что хроническая почечная гипоксия, вызванная гипертензией, а также перекисное окисление липидов, приводящее к образованию активных форм кислорода в проксимальных канальцах, могут способствовать развитию ПКР. Другие факторы риска включают сахарный диабет, профессиональные вредоносные факторы, прием пищи, хронические почечные заболевания и физическую активность. Наиболее популярное и эффективное лечение – частичная или полная нефрэктомия. Пятилетняя выживаемость при паренхиматозном происхождении опухоли составляет 60-70%, однако при возникновении метастазов выживаемость значительно снижается [15, 32, 88]. Опухоль относительно резистентна к лучевой терапии и химиотерапии, но в некоторых случаях отвечает на иммунотерапию. Таргетные препараты (сунитиниб, бевацизумаб, α -интерферон, сорафениб) оказывают существенное влияние на ПКР. Наиболее релевантными причинами развития ПКР являются курение,

ожирение и артериальная гипертензия (около 50% случаев). Предположительно, фактором риска также может быть воздействие асбеста, кадмия, свинца, соединений хлора, полициклических ароматических углеводородов, нестероидных противовоспалительных препаратов.

Наследственные факторы оказывают меньшее влияние на предрасположенность к развитию ПКР. Тем не менее, у родственников больных ПКР риск развития заболевания в 2-4 раза выше, чем в генеральной совокупности. Наследственная папиллярная карцинома почки, наследственный лейомиоматоз, синдром Бёрта-Хога-Дьюба, гиперпаратирозидизм, семейная папиллярная тироидная карцинома, болезнь Гиппеля-Линдау, серповидно-клеточная анемия увеличивают риск развития ПКР.

Пациенты с приобретенной кистозной болезнью почек, нуждающиеся в диализе, развивают ПКР в 30 раз чаще, чем в генеральной совокупности.

ПКР имеет несколько подтипов [26], среди них основные:

- Светлоклеточный ПКР – 60-70% случаев, характерны клетки с прозрачной цитоплазмой, окруженные выраженной цитоплазматической мембраной с круглым гладким ядром. Светлоклеточный рак наиболее распространённый вид дифференцировки, в большинстве случаев носит односторонний характер, с одинаковой частотой развития для каждой почки. Может быть многоочаговым и тогда нередко является двусторонним и сочетается с аденомой. Такой вариант обычно касается лиц с семейным раком и ассоциированными состояниями: кистами почек, синдромом Гиппеля—Линдау, первично-множественными опухолями и др. Характерны перестройки в 3 хромосоме, инактивация гена VHL за счет мутаций и гиперметилирования промотора, амплификация 5 хромосомы, мутации в генах KDM6A/UTX, SETD2, KDM5C/JARID1C и MLL2. В настоящее время в 25–40% случаев заболевание выявляют

случайно при профилактическом обследовании. У 25–30% больных раком почки при начальном обследовании выявляют метастазы;

- Хромофильный (папиллярный) ПКР – 10-15% случаев, состоит из папилл, покрытых одинарным или двойным слоем кубических или больших эозинофильных клеток). Обусловлен трисомией или тетрасомией по хромосомам 7 и 17, утратой Y-хромосомы, амплификацией хромосом 12, 16 и 20, мутациями в протоонкогене Met;
- Хромофобный ПКР – 3-5% случаев, состоит из опухолевых клеток с массивной эозинофильной цитоплазмой, в основном в составе солидной опухоли. Обусловлен делециями хромосом Y, 1, 2, 6, 10, 13, 17 и 21.

Рак почки не является единой болезнью, а представляет собой целый ряд различных и специфических видов рака, которые могут возникнуть в почках. Для каждого из этих типов рака почки могут быть характерны различные гистологические профили, различные клинические курсы, различные ответы на целый ряд терапий. В настоящее время существует по крайней мере двенадцать различных генов, ассоциированных с развитием рака почки. Каждый из них участвует в регуляции важнейших механизмов, включающих способность клетки реагировать на недостаток питательных веществ и изменять ее метаболизм соответствующим образом. Таким образом, эти генные пути вовлечены в способность клетки реагировать на изменения кислорода, железа, питательных веществ или энергии, которые могут ограничивать рост и выгодные изменения, которые могут преодолеть это и стимулировать рост, что крайне полезно в канцерогенезе. Понимание метаболических причин рака почки, даст основу для разработки новых терапевтических подходов, ориентированных на метаболическую основу рака почки.

Многое из того, что мы знаем о генетических основах рака почки стало известно из исследования наследственных форм рака почки. Существует ряд семейных форм рака почки, в том числе Гиппеля-Линдау (VHL), наследственный папиллярный рак почки (HPRC), Бирт - Хогг-Дюбе (БХД), наследственный лейомиоматозный почечно-клеточный рак (HLRCC), сукцинат дегидрогеназный почечно-клеточный рак (SDH-RCC) и болезнь Каудена. Все эти синдромы связаны с наследованием одиночных мутантных копий гена, который значительно увеличивает риск развития разных типов рака почки. Идентификация ассоциированных генов и изучение их функций обозначило метаболическую природу рака почки и дало важное понимание генетики несемейного, спорадического рака почки.

Синдром Гиппеля-Линдау (VHL), или светлоклеточный рак почки, является синдромом наследственного рака почки, при котором пострадавшие подвержены риску развития опухолей в ряде органов, включая почки. Он представляет собой хорошо изученную форму синдрома риска наследственного рака. Пациенты с VHL подвержены риску развития почечной кисты и двустороннего мультифокального рака почки. Эти опухоли всегда светлоклеточного гистологического типа. Предполагается, что пациенты с VHL подвержены риску развития до 600 независимых светлоклеточных опухолей почек и 1300 типов кисты в почках на протяжении всей жизни. Всестороннее изучение темпов роста и метастазирования VHL-ассоциированных опухолей почек превратило клиническое управление в активное наблюдение до тех пор, пока опухоль почки не достигает трех сантиметров в размере. На этом этапе рекомендуют хирургическое вмешательство.

Тем не менее, полный спектр мутаций, характерный для данного вида рака, изучен недостаточно. Также в дополнительном изучении нуждаются метаболические и сигнальные пути, задействованные в развитии ПКР, эпигенетические факторы развития заболевания и профили экспрессии в различных видах рака.

Усиленное потребление глюкозы является биохимической особенностью ПКР, которое используется в диагностике для визуализации опухоли с помощью радиоактивно меченных аналогов глюкозы. Пролиферация раковых клеток зависит от их способности усваивать питательные вещества, необходимые для получения энергии. Глюкоза является одним из главных источников для синтеза АТФ и продукции биомассы.

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1.1. Объект исследования

Объектом исследования служили самцы крыс *Rattus norvegicus* линии Wistar массой 200-250 г, а также образцы ткани почек шести пациентов Воронежского областного клинического онкологического диспансера (ВОКОД) в возрасте от 50 до 75 лет с гистологически подтвержденным светлоклеточным почечно-клеточным раком.

2.1.2. Методы исследования

2.1.2.1 Администрирование аллоксана и SkQ1

Для индукции экспериментальной модели диабета 1 типа когорте крыс (n=30) делали однократную внутривенную инъекцию 5% раствора аллоксана (120 мг вещества на 1 кг массы тела животного, раствор в 0,05 М цитрате натрия). В экспериментальную группу были отобраны животные, уровень глюкозы крови у которых превышал 10 ммоль/л. Уровень глюкозы в крови измеряли с помощью глюкометра OneTouch Select («LifeScan», США). Отдельная когорта животных (n=30) перед инъекцией подвергалась 10-дневной терапии антиоксидантом SkQ1. Крысы получали SkQ1 с питьевой водой (1 мкл 250μМ спиртового раствора SkQ1 на 1 мл питьевой воды).

2.1.2.2 Взятие образцов тканей

Отобранных для экспериментов крыс декапитировали, после чего отбирали органы, предварительно перфузирував их буфером PBS (1X: 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, pH 7.4). Забор материала для микрочипового исследования генной экспрессии при ПКР (опухоль и окружающие здоровые ткани) осуществлялся сотрудниками ВОКОД непосредственно в ходе операции. Отбор пациентов осуществлялся на базе Бюджетного учреждения здравоохранения Воронежской области "Воронежский областной клинический онкологический диспансер". Были выбраны пациенты с гистологически подтвержденным раком почки различных подтипов (светлоклеточная карцинома, хромофобный и папиллярный рак). Использовались ткани почки, удаленной во время операции, из которой были взяты образцы опухолевой ткани и образцы нормальной ткани – максимально удаленной от опухоли и морфологически отличной от нее.

Образцы тканей помещали в раствор RNeasy Protect Tissue (Qiagen, США) и хранили при температуре -86 °С до момента выделения РНК.

2.1.2.3 Экстракция тотальной РНК

Фракцию тотальной РНК из тканей крыс получали методом фенол-хлороформной экстракции с помощью реагента TRIzol (38% фенол, 0,8 М гуанидин тиоцианат, 0,4 М аммония тиоцианат, 0,1 М ацетат натрия, pH 5). Навеску ткани растирали в гомогенизаторе Поттера в течение 30 секунд. Центрифугировали образец при 7500 g 5 мин при температуре 4 °С. Полученный супернатант переливали в новую пробирку, осадок удаляли. Затем добавляли равный объем фенола, 2/5 объема хлороформа, 1/5 объема ацетата натрия и перемешивали на вортексе. Центрифугировали образец 7500 g 15 мин при температуре 4 °С. Тщательно отбирали в новую пробирку

водную фазу, удаляли интерфазу и нижнюю органическую фазу. К водной фазе добавляли равный объем смеси хлороформ/изоамиловый спирт (1:1). Пробирки тщательно перемешивали. Центрифугировали образец при 7500 g 15 мин при температуре 4 °С. Затем вновь отбирали водную фазу и к ней добавляли равный объем хлороформа и центрифугировали 7500 g в течение 15 минут. К полученной в результате водной фазе добавляли три объема изопропанола, инкубировали пробирку в течение 40 минут при -20° С и затем центрифугировали полчаса при 12000 g. Полученный осадок промывали избытком 80% этанола, высушивали и ресуспендировали в 200 мкл mQH₂O. Полученный препарат РНК хранили при -74° С.

Тотальную РНК для полнотранскриптомного анализа генной экспрессии на платформе Affymetrix получали с помощью набора RNeasy Mini Kit («Qiagen», США).

Концентрацию РНК определяли на флюориметре Qubit 2.0 («Thermo Fisher Scientific», США).

Для всех типов тканей использовалась одна методика экстракции, описанная выше. Однако β-клетки островков Лангерганса поджелудочной железы характеризуются очень высоким содержанием рибонуклеаз, что значительно осложняет изучение молекулярно-генетических характеристик ткани. Поэтому для увеличения стабильности РНК и уменьшения ее потерь в ходе экстракции, навески поджелудочной железы крысы подвергались предварительной обработке, которая заключалась в следующем. Образцы ткани мгновенно извлекали и помещали на ледяную рабочую поверхность. Затем с помощью инсулинового шприца по всему объему тканевой массы производились инъекции реагента RNAlater, содержащего гуанидин тиоцианат натрия в качестве консервирующего и стабилизирующего агента. Предварительно обработанная таким образом ткань характеризовалась минимальными потерями РНК в процессе экстракции и качественным препаратом, пригодным для дальнейших манипуляций, на выходе.

Количественный анализ и чистоту препарата РНК осуществляли с помощью спектрофотометра Hitachi. Измеряли поглощение препаратов тотальной РНК при 260 нм, 280 нм и 320 нм. 260 нм – максимум поглощения азотистых оснований в составе нуклеотидов. О чистоте препарата судили по значению отношения A_{260}/A_{280} . При расчете концентрации РНК учитывали значение поглощения при 320 нм, характеризующего степень белкового загрязнения.

2.1.2.4 Проведение аналитического электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле

Электрофоретическое разделение препаратов РНК проводили в 1% агарозном геле (на 100 мл: 1 г агарозы, 2 мл 50X буфера ТАЕ (400мМ Трис-ацетатный буфер, с 50 мМ ЭДТА, рН 8.5), довести дистиллированной водой до требуемого объема). В расплавленный гель добавляли 5 мкл интеркалирующего красителя бромистого этидия (0,1% спиртовой раствор), связывающегося с дву- и одноцепочечными нуклеиновыми кислотами. Электрофорез проводили при напряжении 7 В/см. Визуализацию результатов проводили на трансиллюминаторе TCP-20LM («Vilber Lourmat», Франция) при длине волны 365 нм.

2.1.2.5 Проведение реакции обратной транскрипции

Обратную транскрипцию РНК проводили на приборе Mastercycler Personal («Eppendorf», Германия) с использованием обратной транскриптазы RevertAid («Thermo Fisher Scientific», США).

К 0,1-5 мкг тотальной РНК добавляли 0,5 мкг oligo(dT) праймера и доводили объем реакционной смеси до 12,5 мкл mQ водой. Смесь инкубировали 5 мин при 65 °С для отжига праймеров, после чего пробирки помещали на лед. Использование в качестве затравки oligo(dT) праймеров позволяет селективно получить набор молекул комплементарной ДНК

(кДНК), соответствующих только мРНК. Это достигается путем гибридизации праймеров, содержащих только остатки тимина, на поли(А)-концевом фрагментах разных мРНК

К тотальной РНК с праймерами добавляли смесь, содержащую:

- 4 мкл 5X реакционного буфера для обратной транскриптазы;
- 2 мкл 10 mM dNTP;
- 20 ед. ингибитора рибонуклеаз RiboLock;
- 200 ед. ревертазы RevertAid.

Инкубировали реакцию смесь 60 мин при 42° С и останавливали реакцию путем инкубации в течение 10 мин при 70° С.

2.1.2.6 Проведение qPCR

Количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени (qPCR) проводили на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad», США) с использованием смеси qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген», Россия) согласно следующему протоколу: первичная денатурация 95° С – 3 минуты; 45 циклов, включающих денатурацию при 95° С в течение 30 секунд, отжиг праймеров в течение 30 секунд (температура отжига индивидуальна для каждой пары праймеров), элонгацию цепи при 72° С в течение 30 сек, регистрацию сигнала. После циклической амплификации проводили анализ кривых плавления продуктов реакции в диапазоне температур от 65 до 95° С. Подбор праймеров осуществляли с помощью ресурса Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). При дизайне праймеров руководствовались следующими принципами:

- При планировании места посадки праймеров на матрице необходимо выбирать такие участки, где не возникало бы

проблем с возникновением спонтанных вторичных структур у матрицы;

- В последовательностях праймеров следует избегать G и C отрезков, длина которых превышает три основания. Очень важно, чтобы подобные poly-G и poly-C участки не образовывались на 3'-конце праймера в результате феномена «проскальзывания» полимеразы. Проскальзывание полимеразы происходит во время репликации, когда Taq-полимераза соскальзывает с цепочки матрицы ДНК на реплицируемом участке, а затем вновь закрепляется в более отдаленном месте. В результате новая цепочка ДНК может содержать расширенный участок ДНК;
- Следует убедиться, что большая часть возможных вторичных структур «развернулась» до этапа отжига праймера, также следует подбирать праймеры, температура плавления (T_m) которых выше, чем T_m любой из предполагаемых вторичных структур матрицы;
- Синтез более коротких праймеров увеличивает вероятность случайного, не специфицированного связывания последних с матрицей. Такое случайное связывание праймеров с большей вероятностью может происходить при анализе сложных мишеней, таких как геномная ДНК, и с ним необходимо бороться за счет использования более предсказуемых целевых последовательностей;
- Для использования метода BLAST или средства поиска основного локального выравнивания, можно воспользоваться общедоступными ресурсами, имеющимися на сайте NCBI <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Метод BLAST сопоставляет последовательности праймеров с библиотекой последовательностей геномных ДНК;

- При планировании олигонуклеотидных последовательностей праймеров необходимо избегать самокомплементарных образований праймер-димер на 3' конце.

Полученные последовательности праймеров далее были оптимизированы для ПЦР-анализа. С помощью постановки qPCR в режиме температурного градиента были установлены оптимальные температуры отжига для каждой пары праймеров.

2.1.2.7 Микрочиповый анализ генной экспрессии

Для полнотранскриптомного анализа экспрессии использовали платформу Affymetrix® GeneAtlas™ и микрочипы GeneChip® Rat Gene и Human Gene1.1 ST (Affymetrix Inc.). РНК из опытных образцов была выделена и очищена при помощи набора RNeasy Mini Kit. Пробоподготовка и гибридизация были произведены с использованием набора Ambion® WT Expression Kit («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с протоколом производителя. Гибридизация проводилась в течение 16 часов при температуре 48 °С. Микрочипы были отсканированы на сканере Affymetrix® GeneAtlas™ Imaging Station. Сканирование и оцифровка данных осуществлялось при помощи ПО Affymetrix® GeneAtlas™ Instrument Control Software. Для обработки данных микрочипов, фильтрации фоновых шумов и усреднения значений интенсивности свечения проб по алгоритму RMA и построения списка дифференциально экспрессирующихся генов использовалось программное обеспечение (ПО) Partek Genomics Suite 6.6. Полученные конечные значения дифференциальной экспрессии уровня генов передавались в ПО Ingenuity Pathway Analysis для определения метаболических и сигнальных путей, измененных в данной выборке.

В данном исследовании к анализу допускались образцы со значением $pos_vs_neg_auc > 0,9$. Параметр $pos_vs_neg_auc$ представляет собой отношение интенсивности сигнала положительных контрольных точек на

микрочипе к интенсивности отрицательных, и является средством оценки качества проведенных процедур пробоподготовки и гибридизации.

Фильтрация осуществлялась на основе интенсивности сигнала (интенсивности свечения точки на микрочипе). Критерием для фильтрации обычно является превышение какого-то определенного минимального уровня. В данном исследовании фильтрация проводилась на основе следующего неравенства:

$$S < V_L + 1.5\sigma_{V_L},$$

где S – интенсивность сигнала, V_L – интенсивность фона, σ_{V_L} – стандартное отклонение интенсивности фона.

Фоновая коррекция заключалась в вычитании медианы фоновой интенсивности из интенсивности сигнала. Учитывались только сегменты микрочипа, интенсивность которых превышала фоновое в 2 раза.

Микрочиповые данные были нормализованы по стандартной процедуре ПО Partek Express Affymetrix Edition v.1.1 – интенсивность свечения сегмента микрочипа делилась на глобальное среднее значение.

При статистическом анализе был принят следующий подход: каждый ген проверялся на значимость данных изменения экспрессии с использованием z-теста. Изменение экспрессии считалось достоверным, если уровень значимости p был меньше 0,01. В дальнейшем анализировались гены, экспрессия которых изменялась более чем в 1,5 раза в большую или меньшую сторону при уровне значимости $p < 0,01$. Средняя доля ложных отклонений гипотез (false discovery rate, FDR) была определена по стандартной методике [128].

2.1.2.8 Изоляция митохондрий

Митохондрии выделялись из свежих образцов ткани печени. Ткань печени охлаждали в среде выделения (220mM маннитол, 100 mM сахараза, 1 mM ЭГТА, 2 мг/мл БСА, 20 mM HEPES, pH 7.2-7.4). Ткань измельчали

ножницами, отмывали в среде выделения, гомогенизировали в охлажденном гомогенизаторе Поттера, затем фильтровали. Гомогенат центрифугируется 5 минут при 700g. Супернатант переливается в чистую охлажденную пробирку и центрифугируется 10 минут при 10 000 g. Осадок ресуспендировали в среде промывки (220mM маннитол, 100 mM сахараза, 1 mM ЭГТА, 20 mM HEPES, pH 7.2-7.4) и центрифугировали 10 минут при 10 000 g. Полученный осадок митохондрий суспендировали в этой же среде (~100 мкл). Митохондрии использовались для исследований в течение 2 часов после выделения.

2.1.2.9 Измерение скорости дыхания и продукции перекиси водорода митохондриями

Скорость поглощения кислорода митохондриями регистрировали амперометрически кислородным электродом типа Кларка (Hansatech Instruments, США). Все измерения проводили при 24 °C в 1 мл среды инкубации, содержащей 220 mM маннитол, 100 mM сахаразу, 1 mM ЭГТА, 4 mM фосфат калия, 20 mM HEPES pH 7.3, и субстраты дыхания. Митохондрии (100-200 мкг белка) добавляли в среду регистрации дыхания с последующей добавкой субстратов дыхания, АДФ (200 мМ), карбоксиатрактилата (1 мкМ), и разбщителя 2,4-ДНФ (40 мкМ). Дыхательный контроль рассчитывался как отношение скорости дыхания в присутствии АДФ к скорости нефосфорилирующего дыхания после добавки карбоксиатрактилата. Все измерения выполняли в течение 2 часов после выделения митохондрий.

Измерение скорости генерации H_2O_2 осуществляли флюорометрическим способом на флюориметре Hitachi F-7000 («Hitachi», Япония) в среде выделения того же состава. При работе использовали источник света с максимумом испускания 568 нм. Регистрацию флюоресценции производили при длине волны 581 нм, в кварцевой кювете, содержащей:

- Среда регистрации 2 мл;
- HRP (пероксидаза хрена) 5мкл, 1мг/мл;
- Amplex Red 2 мкл 2 mM;
- Препарат митохондрий 2,5 мкл;
- Сукцинат 6 мкл, 1M;
- Ротенон 2 мкл, 2mM;
- Антимицин 2 мкл, 2 mM.

Измерение скорости образования перекиси водорода производится относительно концентрации пероксида на данный момент времени. В присутствии пероксидазы краситель Amplex Red Ultra вступает в реакцию с пероксидом водорода в соотношении 1:1 с образованием флуоресцентного комплекса резоруфина в интервале pH от 7 до 8. Окисленные продукты этого взаимодействия флуоресцируют в красной области спектра. Концентрация перекиси определялась по изменению уровня флуоресценции

2.1.2.10 Измерение концентрации белка

Содержание митохондриального белка определяли с помощью коммерческого набора Pierce BCA assay («Thermo Fischer Scientific», США).

2.1.2.11 Статистическая обработка данных

Опыты проводились в 3-х повторностях. Аналитическое определение для каждой из проб осуществляли в трех повторностях. В таблицах отражены данные опытов, где каждое из значений является средним арифметическим. Для определения достоверности результатов применяли метод вариационной статистики. При математической обработке использовали статистический критерий Стьюдента.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.2.1. Окислительный стресс при диабете 1 типа

2.2.1.1 Дифференциальная экспрессия генов поджелудочной железы

Диабет в настоящее время рассматривается как комплексное метаболическое заболевание, затрагивающее различные молекулярные аспекты клеточного катаболизма и анаболизма [34, 39, 66, 70, 106, 120, 161, 165, 174]. Наиболее часто упоминаемые в литературе молекулярные мишени, связанные с диабетом и АФК, относятся к «метаболическим процессам» [76]. Полнотранскриптомный анализ генной экспрессии на микрочипах позволяет составить первичную картину ответа генома на изменения факторов среды. Исследования генной экспрессии пациентов с диабетом 2 типа [109] показали, что гены, наиболее драматично меняющие свою экспрессию, относятся к путям метаболизма глюкозы, липидов, аминокислот, окислительного стресса, апоптоза. Использование микрочипового анализа в исследовании биоптатов пациентов с диабетом 2 типа выявило регулируемый физическими нагрузками паттерн генной экспрессии [66], дифференциальную регуляцию сигнальных путей инсулина [126]. Большинство исследований с применением данной технологии относятся к изучению диабета 2 типа ввиду его распространенности. Однако есть вероятность, что генетические локусы, ассоциированные с диабетом 2 типа, не играют очевидной роли в предрасположенности к диабету 1 типа, что повышает значимость исследований его экспрессионной регуляции, что позволит обосновать различные подходы к разработке новых превентивных или терапевтических стратегий для 1 и 2 типа диабета [77, 134]. Гипотеза акселераторов Уилкина постулирует, что диабет – единое заболевание, а не две самостоятельные разновидности, 1 тип и 2 тип. Он полагает, что два типа диабета различаются только по скорости потери поджелудочной железой β -

клеток, за что отвечают разные акселераторы, один из которых – потенциал к высоким темпам апоптоза β -клеток ввиду их метаболической активности [36].

С помощью платформы Affymetrix нами проведен полнотранскриптомный анализ генной экспрессии клеток поджелудочной железы и выявлены гены, экспрессия которых подверглась наибольшему изменению. В Таблицах 1 и 2 представлены данные об экспрессии наиболее активных генных мишеней.

Таблица 1.

Гены поджелудочной железы с отрицательной регуляцией при диабете.

Название	Символ	RefSeq	Изменение экспрессии
cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 2	Cyp4a2	NM_001044770	-740.44
aldolase B, fructose-bisphosphate	Aldob	NM_012496	-496.15
cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 8	Cyp4a8	NM_031605	-437.567
cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 23	Cyp2c23	NM_031839	-410.072

Таблица 1 (продолжение).

Гены поджелудочной железы с отрицательной регуляцией при диабете.

solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	Slc17a3	NM_153622	-404.343
aldo-keto reductase family 7, member A3	Akr7a3	ENSRNOT0 0000024160	-355.035
glucose-6-phosphatase, catalytic subunit	G6pc	NM_013098	-320.41
D-amino-acid oxidase	Dao	NM_053626	-317.893
cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 3	Cyp4a3	NM_175760	-297.59
solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter)	Slc5a12	NM_001108 588	-274.013
phenylalanine hydroxylase	Pah	NM_012619	-272.971
carbonic anhydrase 12	Car12	NM_001080 756	-257.674
solute carrier family 3, member 1	Slc3a1	ENSRNOT0 0000009581	-248.767

Таблица 1 (продолжение).

Гены поджелудочной железы с отрицательной регуляцией при диабете.

transmembrane protein 27	Tmem27	ENSRNOT0 0000005348	-247.644
glycine-N-acyltransferase	Glyat	ENSRNOT0 0000016454	-242.687
Na ⁺ dependent glucose transporter 1	Nagl1	ENSRNOT0 0000057218	-238.082
myo-inositol oxygenase	Miox	NM_145771	-236.87
solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 8	Slc22a8	NM_031332	-236.022
hydroxyacid oxidase 2 (long chain)	Hao2	NM_032082	-223.685
solute carrier family 38, member 3	Slc38a3	ENSRNOT0 0000023623	-210.336
glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B15	Ugt2b15	NM_001004 271	-205.589
low density lipoprotein receptor-related protein 2	Lrp2	NM_030827	-199.994

Таблица 1 (продолжение).

Гены поджелудочной железы с отрицательной регуляцией при диабете.

cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 1	Cyp4a1	NM_175837	-192.945
aminoadipate aminotransferase	Aadat	NM_017193	-182.88
maltase-glucoamylase	Mgam	ENSRNOT0000016912	-179.924
solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 1	Slc34a1	NM_013030	-165.298
sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	Sult1c2	NM_133547	-160.594
solute carrier family 22 (organic anion/urate transporter)	Slc22a12	NM_001034943	-159.922
solute carrier family 22 (organic anion transporter)	Slc22a6	ENSRNOT0000024757	-158.401
solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters)	Slc13a1	ENSRNOT0000010788	-157.091

Таблица 1 (продолжение).

Гены поджелудочной железы с отрицательной регуляцией при диабете.

fructose-1,6-bisphosphatase	Fbp1	NM_012558	-139.802
hepatocyte nuclear factor 4, alpha	Hnf4a	NM_022180	-138.522
glucosidase, beta, acid 3 (cytosolic)	Gba3	NM_001106010	-129.94
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Hpd	NM_017233	-126.564
sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	Sult1c2	NM_133547	-123.009
kallikrein 1	Klk1	NM_031523	-122.551
cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 1	Cyp4f1	NM_019623	-120.946
cadherin-related family member 5	Cdhr5	NM_138525	-118.204
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A4	Atp6v0a4	NM_001106591	-115.653

Таблица 1 (продолжение).

Гены поджелудочной железы с отрицательной регуляцией при диабете.

sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	Sult1c2	NM_133547	-115.399
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter)	Slc2a2	ENSRNOT0000015866	-114.232
leucine rich repeat containing 19	Lrrc19	NM_001109413	-111.974
cytochrome P450, family 24, subfamily a, polypeptide 1	Cyp24a1	ENSRNOT0000046011	-100.12
aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	Aldh1a1	NM_022407	-100.032

В наибольшей степени отрицательно регулируемыми оказались гены белков-переносчиков (*Naglt1* – ген, кодирующий Na⁺-зависимый переносчик глюкозы, вовлеченный в реабсорбцию глюкозы), путей метаболизма углеводов (*G6pc*, *Fbp21* (глюконеогенез), *Gba3*, *Aldob*), аминокислот (*Dao*, *Pah*). Почти в 320 раз снижена экспрессия генов *G6pc* и *Dao*. Глюкозо-6-фосфатаза, кодируемая *G6pc*, участвует в глюконеогенезе и катализирует конверсию глюкозо-6-фосфата и воды в D-глюкозу. Фермент может проявлять активность в островках, но его функции в данной ткани не ясны [53]. Регуляция мРНК *G6pc* в глюконеогенных тканях регулируется

глюкозой, а также инсулином. Ввиду неясной роли фермента в поджелудочной железе столь значительное снижение экспрессии соответствующего гена можно объяснить регуляцией по принципу отрицательной обратной связи инсулином, резкое высвобождение которого сопровождается разрушением β -клеток. D-аминоацил оксидаза, продукт гена *Dao*, может служить маркером тканевых повреждений. Так, снижение энзиматической активности DAO коррелирует с ишемией у крыс [186]. Следует отметить, что среди генов со значительно сниженным уровнем экспрессии, но не вошедших в Таблицу 1, присутствуют также гены ферментативной системы защиты от АФК (*Gsta2* (-48), *Gpx2* (-40), *Gstt3* (-23), *Gsta4* (-22), *Gstp1* (-7,8), *Txnrd1* (-7,6), *Gsr* (-4), *Nqo1* (-7,5)), фактор транскрипции *Ppara*, регулирующий экспрессию генов метаболизма жирных кислот и играющий роль в регуляции секреции инсулина и детоксикации липидов [87] и компоненты ЭТЦ митохондрий (*Atp6v1g3* (-7,65)). При диабете в клетках поджелудочной железы согласно данным полнотранскриптомного анализа генной экспрессии снижается экспрессия нескольких представителей цитохрома P450. Ген *Cyp4a2*, кодирующий второй полипептид подсемейства α четвертого семейства цитохромов P450, характеризовался максимальным уровнем снижения экспрессии (-740,4). Оверэкспрессия *Cyp4a2* может привести к повреждению почек посредством усиленной продукции 20-гидроксиэйкосатетреновой кислоты (20-HETE) [80], кроме того функции этой изоформы цитохрома P450 в почках регулируются оксидом азота [69].

Показана отрицательная регуляция ряда генов группы *Slc*. Продукты этих генов - семейство митохондриальных белков-переносчиков растворимых веществ. Представители SLC, в частности SLC25, локализируются на внутренней митохондриальной мембране и опосредуют перенос множества промежуточных продуктов метаболизма (например, АТФ/АДФ, карбоновых и аминокислот, ионов) между цитоплазмой и митохондриями. Митохондриальные разобщающие белки представляют

собой наиболее хорошо изученную подгруппу семейства SLC25. Это UCP1 (SLC25A7), экспрессирующийся в буром жире и четыре гомолога UCP1 (UCP2-5): UCP2 (SLCA25A8) экспрессируется повсеместно; UCP3 (SLC25A9) преимущественно локализуется в скелетных мышцах, сердце и буром жире; UCP4 (SLC25A27) и UCP5 (SLC25A14, локализующийся в мозге митохондриальный переносчик 1, VMCP1) экспрессируются в первую очередь в центральной нервной системе.

Таблица 2.

Гены поджелудочной железы с положительной регуляцией при диабете.

Название	Символ	RefSeq	Изменение экспрессии
carbonic anhydrase 3	Car3	ENSRNOT 0000001418 0	238.775
complement factor D (adipsin)	Cfd	ENSRNOT 0000001502 9	151.111
CD163 molecule	Cd163	NM_00110 7887	128.973
fatty acid binding protein 4, adipocyte	Fabp4	ENSRNOT 0000001470 1	122.574

Таблица 2 (продолжение).

Гены поджелудочной железы с положительной регуляцией при диабете.

proteoglycan 4	Prg4	NM_00110 5962	108.216
adiponectin, C1Q and collagen domain containing	Adipoq	NM_14474 4	95.111
carboxypeptidase A3, mast cell	Cpa3	NM_01930 0	92.5555
melanocortin 2 receptor (adrenocorticotropic hormone)	Mc2r	NM_00110 0491	79.079
thyroid hormone responsive	Thrsp	NM_01270 3	77.1706
lumican	Lum	ENSRNOT 0000000610 9	76.2016
folate receptor 2 (fetal)	Folr2	NM_00110 6283	73.2836
retinol binding protein 7, cellular	Rbp7	NM_00110 8693	72.2651

Таблица 2 (продолжение).

Гены поджелудочной железы с положительной регуляцией при диабете.

coagulation factor XIII, A1 polypeptide	F13a1	NM_02169 8	64.0512
chemokine (C-C motif) ligand 6	Ccl6	ENSRNOT 0000004586 7	62.6849
ADP-ribosylation factor-like 11	Arl11	NM_00101 3433	60.7463
resistin-like gamma	Retnlg	ENSRNOT 0000000267 3	55.8642
neuronatin	Nnat	NM_05360 1	54.8707
aldo-keto reductase family 1, member C14	Akr1c14	NM_13854 7	50.1795
myeloperoxidase	Mpo	NM_00110 7036	48.3419
albumin	Alb	NM_13432 6	45.6535

Таблица 2 (продолжение).

Гены поджелудочной железы с положительной регуляцией при диабете.

insulin-like growth factor 1	Igf1	NM_00108 2478	44.7559
phospholipase A2, group IID	Pla2g2d	NM_00101 3428	44.2707
stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	NM_13919 2	43.0287
chordin-like 1	Chrdl1	ENSRNOT 0000000600 8	41.8703
periostin, osteoblast specific factor	Postn	NM_00110 8550	40.6471
mast cell protease 2	Mcpt2	NM_17204 4	39.6832
integrin, alpha M	Itgam	ENSRNOT 0000002674 8	39.2847
tubulin polymerization- promoting protein family member 3	Tppp3	NM_00100 9639	37.1355

Таблица 2 (продолжение).

Гены поджелудочной железы с положительной регуляцией при диабете.

serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin)	Serpinb1 0	NM_15373 3	36.7845
mannose receptor, C type 1	Mrc1	NM_00110 6123	36.1672
membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B-like	Ms4a6b1	NM_00100 6975	36.025
CD84 molecule	Cd84	NM_00119 2006	35.846
immunoreceptor Ly49si2	Ly49si2	NM_00100 9498	34.9342
chemokine-like receptor 1	Cmklr1	NM_02221 8	34.5285

Наибольшим уровнем экспрессии характеризовался ген *Car3*, кодирующий фермент карбоангидразу 3, который катализирует реакцию гидратации диоксида углерода и может принимать участие в клеточном ответе на окислительный стресс [20, 91, 143]. В 95 раз возрастала экспрессия гена *Adipoq*, кодирующий адипонектин - цитокин, играющий роль в связанной с ожирением резистентности к инсулину, вовлеченный в развитие

микрососудистых осложнений при диабете [74], регулятор экспрессии гемоксигеназы-1 при кардиомиопатии [100], регулятор метаболизма холестерина в печени [99]. Поджелудочная железа крысы в условиях экспериментального диабета характеризуется увеличением (в 76 раз) экспрессии гена люмикана, белка-представителя протеогликанов, *Lum*. Возрастание экспрессии *Lum* рассматривается как маркер повреждения поджелудочной железы. В частности экспрессия гена возрастает при индуцированном панкреатите [118]. На фоне снижения экспрессии генов системы защиты АФК наблюдается значительное увеличение (48,3 раза) экспрессии гена миелопероксидазы (*Mpo*) в поджелудочной железе, которая способна посредством нитрирования белков образовывать активные формы азота, внося вклад в развитие окислительного стресса [59, 168, 171, 176]. В 45,65 возрастала экспрессия гена альбумина *Alb*, который также может выполнять сигнальную роль в метаболизме оксида азота NO, являющимся свободным радикалом, и участвовать в образовании S-нитрозотиолов [113, 135]; в условиях повышенной концентрации глюкозы ухудшаются транспортные свойства альбумина вследствие снижения проницаемости клеток для него [49, 132]. Повышенным уровнем экспрессии характеризовался целый ряд представителей суперсемейства иммуноглобулинов: *CD84* (35,85), *CD68* (34,09), *CD 38* (30,08). Среди них наибольший уровень экспрессии демонстрировал *CD163* (129 раз). Экспрессия этой маркерной молекулы возрастает при различных патологиях, включающих цирроз печени, диабет, синдром активации макрофагов [85, 123, 187].

2.2.1.2 Экспрессия генов белков-компонентов системы защиты от АФК в клетках поджелудочной железы крыс

Технология полнотранскриптомного анализа экспрессии дает максимально полное, но первичное представление о адаптации генома

клетки (ткани) к изменяющимся условиям среды. Такие ограничения обусловлены дороговизной и продолжительностью анализа, а также дополнительными интерферирующими внешними эффектами, возникающими вследствие микрообъемов рабочих жидкостей. Поэтому данные, полученные с микрочипов, необходимо дополнительно выборочно проанализировать с помощью количественной ПЦР в реальном времени [4]. Для изучения экспрессионной регуляции системы защиты поджелудочной железы от АФК нами были выбраны следующие гены-мишени [21, 65, 90]:

- *Gsr*. Ген глутатион редуктазы (КФ 1.8.1.7.), катализирующей восстановление окисленного глутатиона в митохондриальном матриксе. Праймеры для ПЦР (от 5'-конца к 3'-концу): Forward CACTTCCCGGTAGGAAACCC; Reverse GATCGCAACTGGGGTGAGAA.
- *Gsta3*. Ген глутатион S-трансферазы (КФ 2.5.1.18) изоформы альфа 3. Фермент катализирует реакцию конъюгации между GSH и токсинами [124]. Праймеры для ПЦР (от 5'-конца к 3'-концу): Forward CCAACTGTTTAGCAACTCAGGC; Reverse GCATACATGTTCGATGAGGGC.
- *Gstt1*. Ген глутатион S-трансферазы тета-1 (КФ 2.5.1.18). Праймеры для ПЦР (от 5'-конца к 3'-концу): Forward AGACCGAATAGCGAGCAGAC; Reverse GGAATTCCAACAGCCCAGGA.
- *Prdx3*. Ген третьей изоформы тиоредоксин-зависимой пероксид редуктазы (пероксиредоксина 3) (КФ 1.11.1.15), группы энзимов, восстанавливающих перекись водорода и гидроперекиси липидов [64]. Праймеры для ПЦР (от 5'-конца к 3'-концу): Forward GTGGTTTGGGCCACATGAAC; Reverse TGGCTTGATCGTAGGGGACT.

- *Prdx5*. Праймеры для ПЦР (от 5'-конца к 3'-концу): Forward CAGCTGAGGTTTTGCGTCCT; Reverse CCAGGCAGATGGGTCTTGGA.
- *Cat*. Ген каталазы (КФ 1.11.1.6.), катализирующей превращение перекиси водорода в молекулярный кислород и воду. Праймеры для ПЦР (от 5'-конца к 3'-концу): Forward TTTTCACCGACGAGATGGCA; Reverse AAGGTGTGTGAGCCATAGCC.
- *Sod1*. Ген супероксид дисмутазы [Cu-Zn] (КФ 1.15.1.1), катализирующей конверсию супероксида в перекись водорода и молекулярный кислород. Праймеры для ПЦР (от 5'-конца к 3'-концу): Forward TTTTGCTCTCCCAGGTTCCG; Reverse CCCATGCTCGCSTTCAGTTA.
- *Sod2*. Ген митохондриальной супероксид дисмутазы 2 (марганец-зависимой) (КФ 1.15.1.1). Праймеры для ПЦР (от 5'-конца к 3'-концу): Forward TAAGGGTGGTGGAGAACCCA; Reverse TGATGACAGTGACAGCGTCC.

Дополнительно исследовали экспрессию генов NO-синтазы *Nos2* (f-GTTCCTCAGGCTTGGGTCTT; r-GTTCCTCAGGCTTGGGTCTT) и *Nos3* (f-CAGCGCTGATGGAAATGTCG; r-AAGAGCCTCTAGCTCCTGCT), а также гены белков теплового шока *Hsp90aa1* (f-GGTTAGTCACGTTTCGTGCG; r-ACTAGGGTTCGGTCAAGCTCT) и *Hsp90ab1* (f-AGATTCCACTAACCGACGCC; r-CCGCACTCGCTCCACAAA).

Препараты тотальной РНК для ПЦР-анализов получали методом фенол-хлороформной экстракции. При этом навески поджелудочной железы, которая содержит большое количество рибонуклеаз, сразу после изъятия и перед гомогенизацией перфузировали ледяным реактивом RNeasy. Это позволило значительно снизить потери при экстракции и в итоге получить препараты, пригодные для дальнейших манипуляций (Рис. 5).

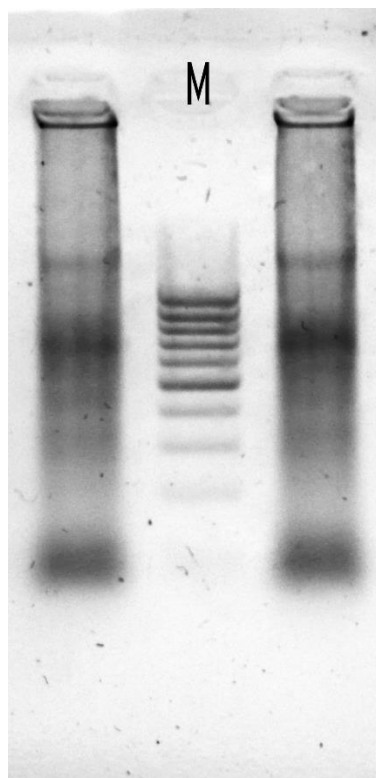


Рис. 5. Электрофореграмма препарата тотальной РНК из поджелудочной железы крысы.

С помощью oligo(dT) праймеров и ревертазы RevertAid с 5'→3' полимеразной активностью, эффективной только в отношении матриц РНК, была проведена реакция обратной транскрипции, что позволило нам получить набор кДНК (Рис. 6).

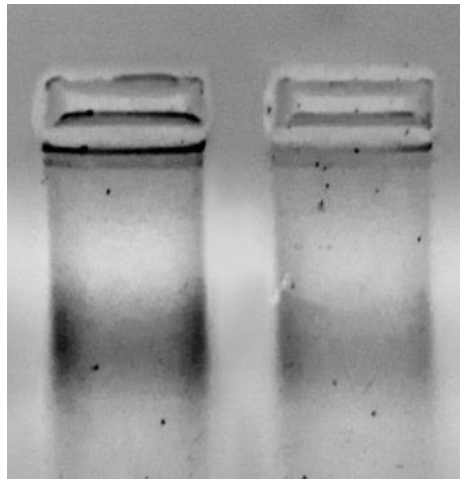


Рис. 6. Электрофореграмма кДНК после обратной транскрипции с oligo(dT) праймерами.

Для нормализации результатов qPCR в качестве внутреннего контроля при постановке реакций использовали праймеры к фрагменту гена 18S рРНК [97].

Здесь и далее эксперименты с применением метода qPCR проводили согласно рекомендациям Bustin [18].

Все реакции амплификации подчинялись стандартной кинетике, при которой на кривой накопления продукта ПЦР четко выделяются начальная, логарифмическая фазы и фаза насыщения (плато) (Рис. 7).

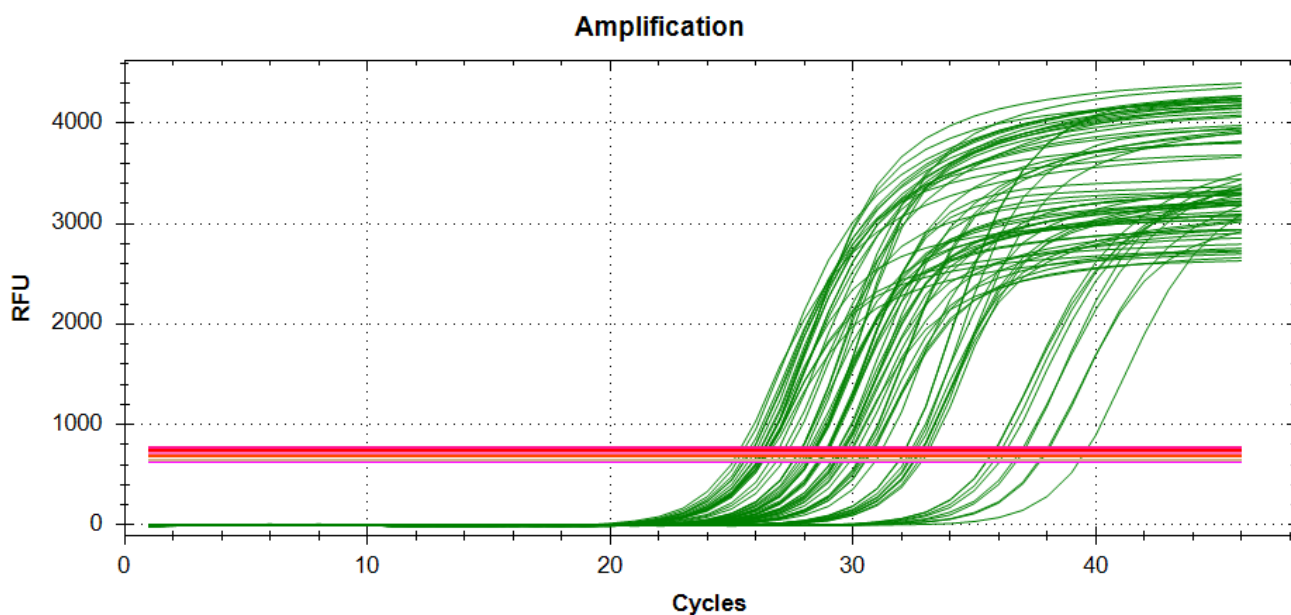


Рис. 7. Кинетика реакции накопления продуктов амплификации.

Значение порогового сигнала флюоресценции рассчитывалось автоматически программным обеспечением Bio-Rad CFX Manager 3.1 («Bio-Rad», США). Значение C_q (C_t в некоторых источниках) определялось по единичной базовой линии (метод single threshold).

На рис. 8 представлены данные экспрессии генов системы защиты от АФК в поджелудочной железе крыс с экспериментальным диабетом 1 типа, выраженной в условных единицах флюоресценции (статистическая погрешность на гистограмме равна стандартной ошибке среднего (SEM)).

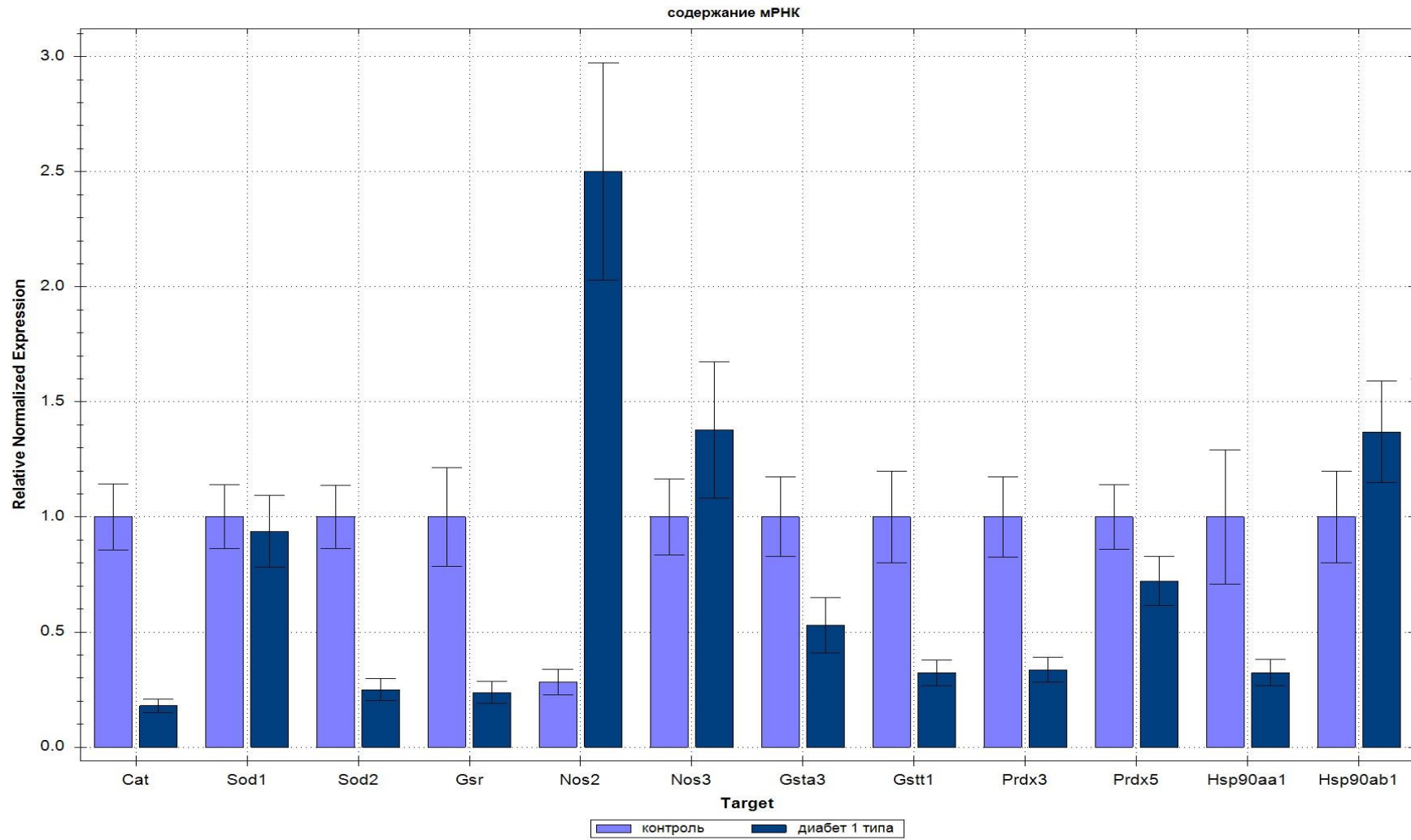


Рис. 8. Профиль генной экспрессии компонентов ферментативной системы защиты от АФК.

Показано, что паттерн экспрессии выбранных нами генов-мишеней имеет четко выраженный характер. Экспрессия почти всех генов снижается в условиях окислительного стресса при диабете. Так, экспрессия *Cat* при диабете ниже контрольного значения (здоровые животные) в 5,57 раз, *Gsr* – в 4,2 раза, *Gsta3* – в 1,9 раз, *Gstt1* и *Hsp90aa1* – в 3,1 раза, *Prdx3* – в 2,98 раз, *Sod2* – в 4 раза. Однако некоторые гены демонстрируют повышенную экспрессию при диабете, что видно на соответствующей кластерограмме (Рис. 9).

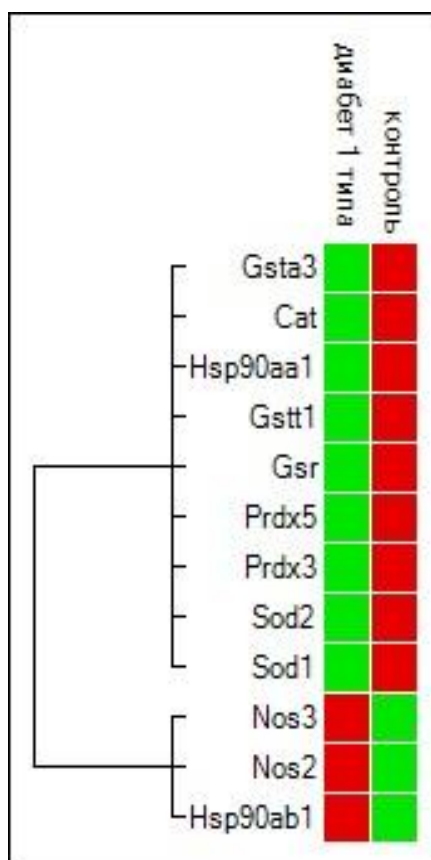


Рис. 9. Результаты кластеризации данных экспрессии.

Различной степени выраженности снижение экспрессии генов ферментов защиты клетки от пагубного воздействия АФК может объясняться высоким содержанием окисленных белков, липидов и ДНК при диабете, вследствие чего снижаются способности клетки к детоксикации свободных радикалов. Подобная ситуация, по-видимому, складывается при диабетической ретинопатии, когда наблюдается значительное снижение

содержания SOD, GPx и CAT в сыворотке крови пациентов [44]. Снижение антиоксидантного статуса клетки, в частности дефицит супероксид дисмутазы, ассоциировано с прогрессией окислительного стресса не только при диабете, но и при печеночно-клеточной карциноме и возрастной атрофии скелетной мускулатуры [45, 116]. Снижение содержания мРНК для митохондриального пероксиредоксина 3 также иллюстрирует ухудшение антиоксидантного статуса клеток поджелудочной железы, так как пероксиредоксин 3 способен защищать как от АФК, так и от АФА, а его оверэкспрессия защищает β -клетки от апоптоза [173]. Интересным оказалось снижение почти в 3 раза экспрессии гена белка теплового шока *Hsp90aa1*. В различных исследованиях эта молекула оказывала протекторное антиапоптотическое действие на клетки культуры миокарда [83] и нервные клетки коры головного мозга крыс [92].

В противовес генам ферментов антиоксидантной защиты экспрессия гена индуцибельной NO-синтазы *Nos2* статистически достоверно возрастает в 8,8 раза. Это можно объяснить цитокин-зависимой природой индуцибельности фермента [184], а как следует из проведенного нами полнотранскриптомного экспрессионного анализа экспрессия сразу нескольких сигнальных молекул цитокинов и иммуноглобулинов значительно повышена в клетках поджелудочной железы. Кроме того, индукция *Nos2* может объясняться особенностями действия аллоксана, токсический эффект которого включает генерацию активных форм азота [164].

Специфичность амплификации генов-мишеней при проведении qPCR подтверждали плавлением продуктов реакции в диапазоне температур от 65° С до 95° С после основных циклов каждого прогона. На рис. 10 показано соответствие кривых плавления продуктов ПЦР стандартному виду, при котором продукту амплификации каждой отдельной мишени соответствует ярко выраженный температурный пик.

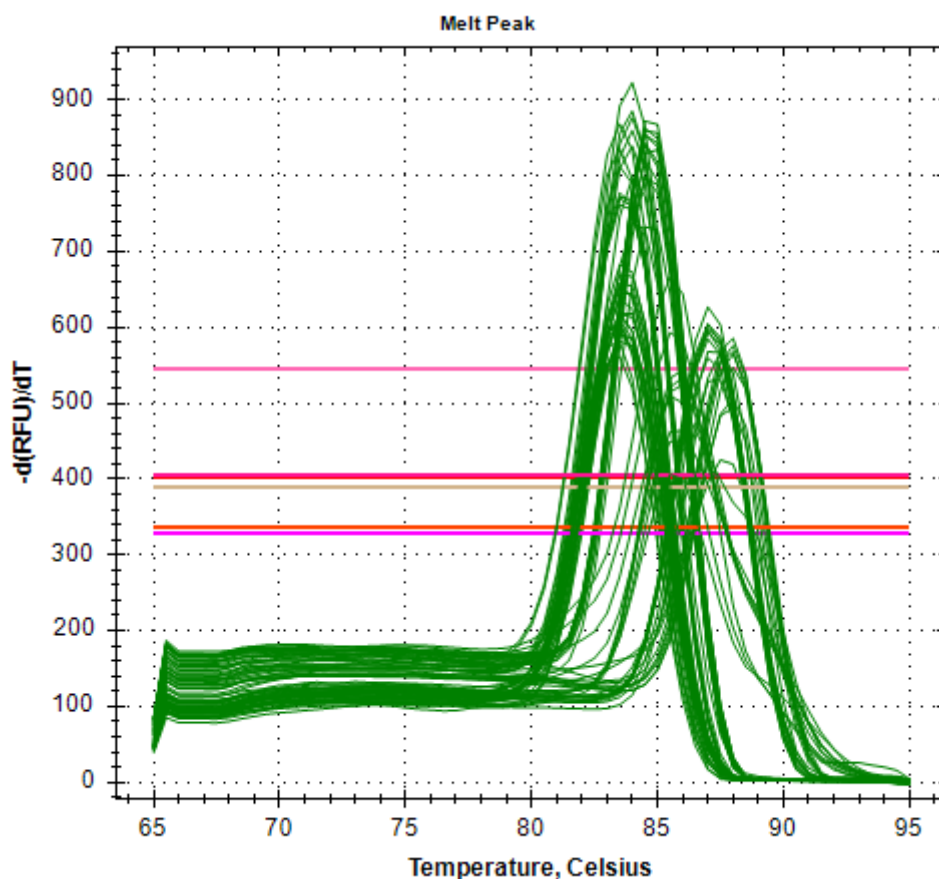


Рис. 10. Температурные кривые плавления продуктов амплификации при постановке qPCR.

2.2.1.3 Изучение влияния SkQ1 на экспрессию генов окислительного метаболизма

В условиях высокой степени окисленности белков, липидов и ДНК в клетках, подверженных окислительному стрессу, существует две наиболее очевидные возможности нормализации функционирования клеточного метаболизма: во-первых, фармакологическая модуляция компонентов митохондриального метаболизма (системы защиты от АФК), во-вторых, введение экзогенных молекул-антиокислителей, способных нейтрализовать избыток образующихся свободных радикалов. Последствия окислительного повреждения мембран клеток включают в себя уменьшение электрического сопротивления мембраны, повреждение кардиолипина, необходимого для

функционирования белков ЭТЦ, повреждение митохондриальной ДНК, что вызывает дисфункцию митохондрий и индукцию апоптотических каскадов [33]. Разработанные под руководством академика В.П. Скулачева антиоксиданты группы SkQ, связанные с митохондриально-направленными проникающими катионами, в теории способны эффективно функционировать на начальных этапах событий, описанных выше, путем связывания и нейтрализации АФК внутри митохондрий [156, 157, 169].

Нами было изучено влияние пре-терапии SkQ1 на экспрессионную регуляцию некоторых генов-мишеней окислительного метаболизма в поджелудочной железе крыс с экспериментальным диабетом. Для селективной амплификации выбранных нами генов мы использовали следующие пары праймеров:

- *Trp53*: f-AGCGACTACAGTTAGGGGGT,
r-GACAGGCACAAACACGAACC;
- *Ant*: f-GGGGATCAGGCTTTGAGCTT,
r-CGTTGGACCAAGCACCTTTG;
- *Etfdh*: f-GCTGTCCTGCCCTGCATATC,
r-ACAGCTGGCCCTCAAATCAA;
- *Nrf1*: f-TTTAAGGTGTTTGGCGCAGC,
r-TGCATGAACTCCATCTGGGC;
- *Ucp2*: f-TGTGGTAAAGGTCCGCTTCC,
r-TGAGCTTGCTTTATGGGCGA;
- *Ucp3*: f-TCGCCAGATGAGTTTTGCCT,
r-CTTCTTCCCTGGCGATGGTT.

На рис. 11 представлены результаты qPCR-анализа.

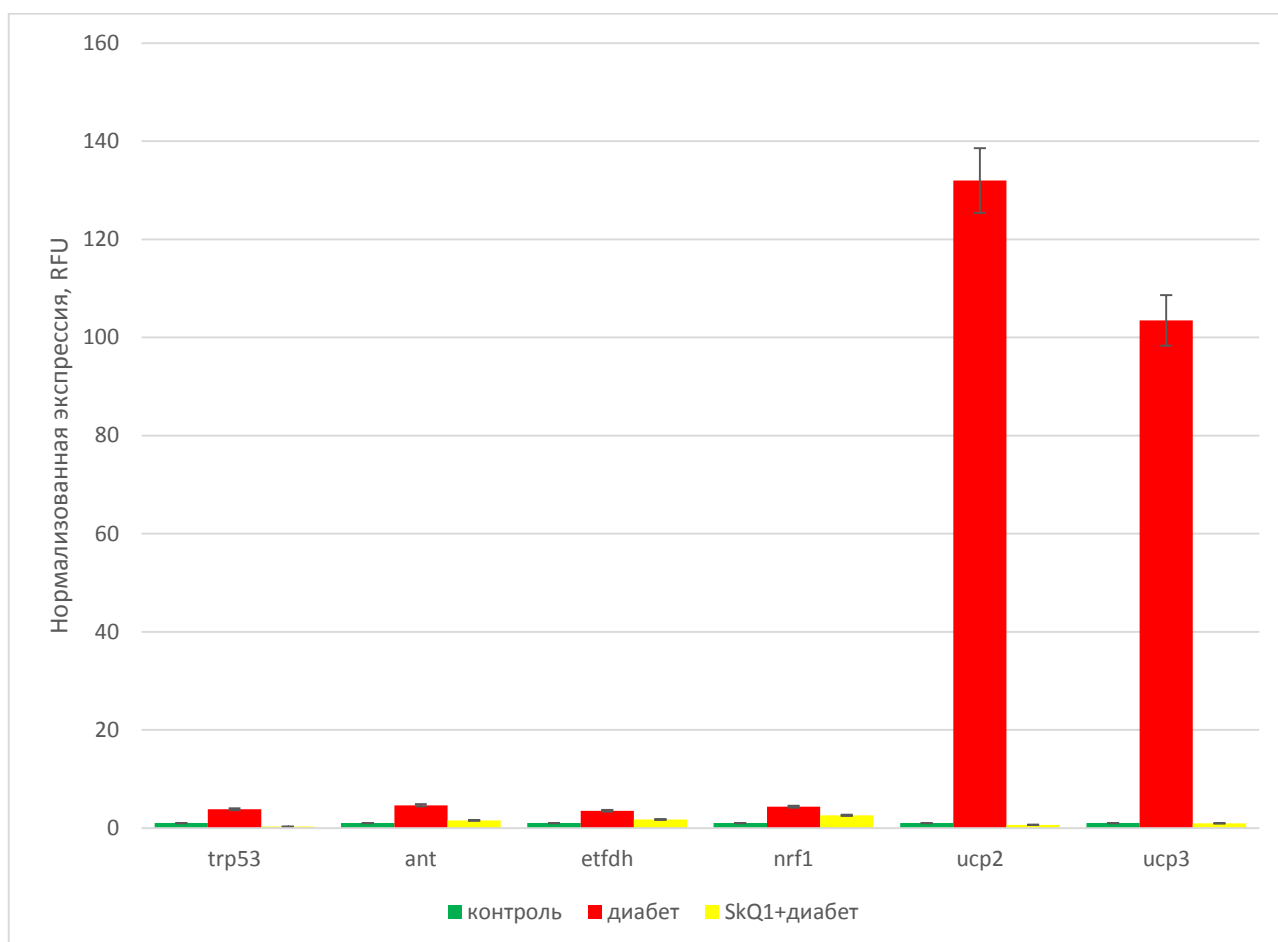


Рис. 11. Эффект антиоксиданта SkQ1 на характер экспрессии генов окислительного метаболизма.

В присутствии антиоксиданта SkQ1 уровни экспрессии практически всех изученных генов равнялись таковым в состоянии контроля. Экспрессия гена *Ucp2*, кодирующего митохондриальный белок-переносчик, возрастала в условиях окислительного стресса (диабета) примерно в 132 раза. При предварительной терапии SkQ1 экспрессия *Ucp2* снижалась в полтора раза относительно контроля, однако статистически оставалась такой же. Похожая ситуация обстоит с геном третьей изоформы разобщающего белка. Ген *Ucp3* при экспериментальном диабете увеличивал экспрессию в 103,5 раза. SkQ1 снижал это значение практически до состояния нормы (0,97 условных единиц против 1 у контроля). В 3,9 раза при диабете возрастает экспрессия гена *Trp53*, молекулярного маркера патологических состояний. Пре-терапия

SkQ1, напротив, снижает в 3,8 раза экспрессию *Trp53* относительно контроля. Видимо, это связано с особенностью этого фактора транскрипции активно реагировать на повреждение клеток, запуская транскрипцию проапоптотических и прооксидантных генов. Активное противодействие SkQ1 избыточной генерации АФК подавляет эту активность *Trp53*. Незначительно (в 0,6 раза) повышается экспрессия гена *Etfdh* в условиях предварительной терапии диабета. В то время как без нее экспрессия *Etfdh* выше контрольного значения в 3,5 раза. Уровни экспрессии *Ant* и *Nrf1* при диабете повышаются в 4,64 и 4,35 раза, соответственно. Известно, что окислительный стресс активирует опосредуемый *Ucp2* ток протонов через внутреннюю мембрану митохондрий [42, 52, 98]. Помимо снижения мембранного потенциала это имеет своим эффектом также ингибирование секреции инсулина, которая зависима от АТФ [22]. Предполагается, что активируемый окислительным стрессом *Ucp2*-зависимый ток протонов может быть фармакологически ингибирован, что впоследствии усилит секрецию инсулина и воспрепятствует дисфункции β -клеток [133]. Этим можно объяснить ингибирующий эффект SkQ1 на экспрессию *Ucp2*. Учитывая роль белков семейства UCP в защите от АФК, регуляции метаболизма липидов и секреции инсулина, многие авторы считают воздействие на экспрессию генов этих белков (в частности, подавление транскрипции гена *ucp2* или ингибирование самого белка) удобной мишенью для устранения дефектов секреции инсулина при диабете. SkQ1 нейтрализует возникающие в митохондриях АФК, в том числе активатор *Ucp2* – супероксид. Согласно гипотезе В.П. Скулачева, супероксидный радикал является вторичным мессенджером в сигнальной системе, регулирующей экспрессию генов *ucp 2* и *ucp 3*, и влияет на геном живых организмов, активируя синтез разобщающих белков [145]. Другим возможным механизмом является накопление в клетке АМФ, в следствие неправильной работы ЭТЦ, и как следствие, отсутствия синтеза АТФ. Происходит активация АМФ-активированных протеинкиназ, которые через

каскад реакций оказывают активирующее действие на промоторную область исследуемых генов [87].

Эффект SkQ1 наглядно демонстрируют результаты исследования уровня глюкозы в крови животных различных экспериментальных групп (рис. 12).

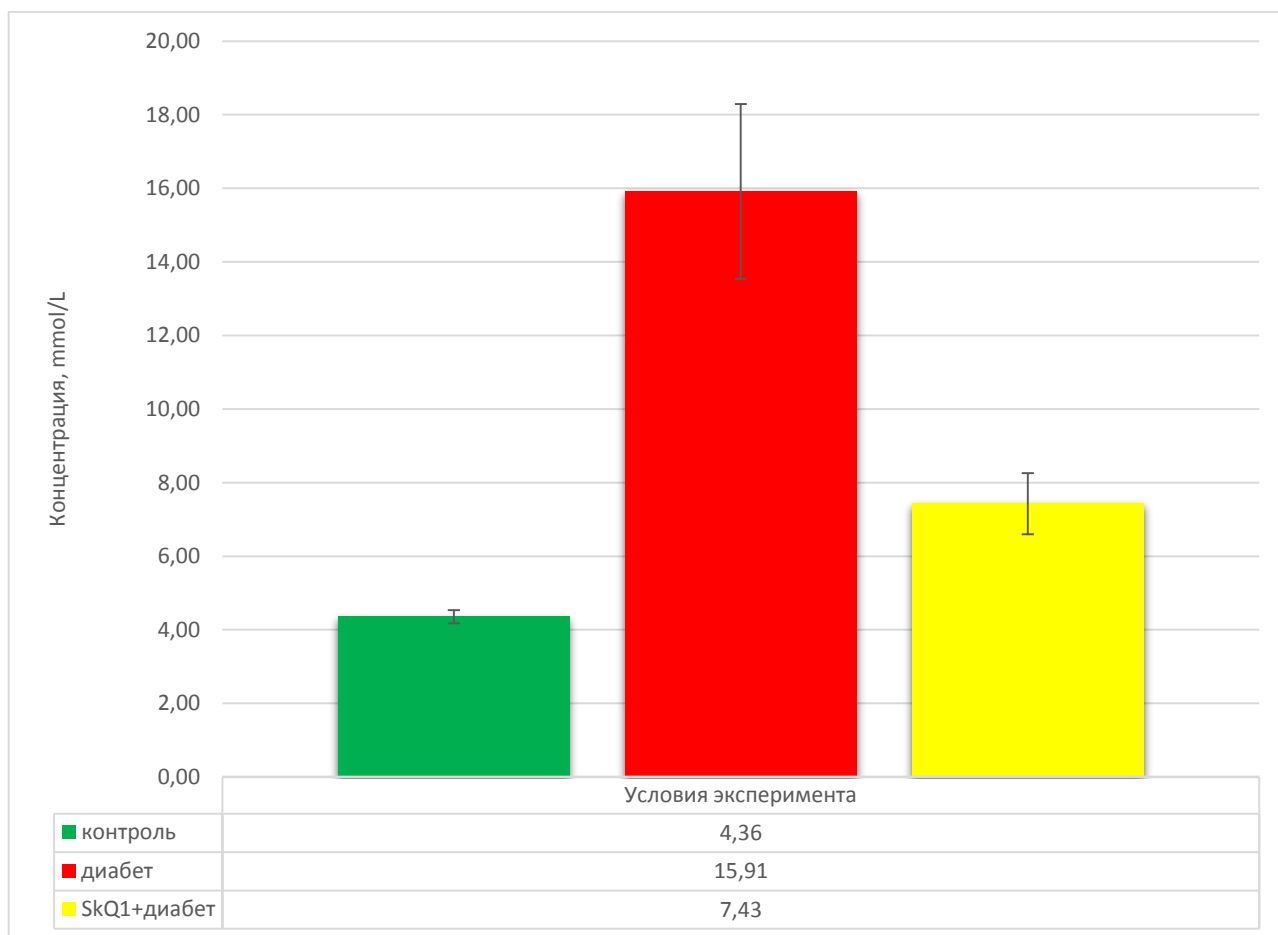


Рис. 12. Влияние SkQ1 на гипергликемию при экспериментальном диабете (n=13).

После инъекции аллоксана у 70-80% животных через 10 суток развивается стабильная модель инсулинозависимого диабета, характеризующегося гипергликемией. Это выражается повышении уровня глюкозы в среднем до 15,91 ммоль/л (на фоне контрольных 4,36 ммоль/л).

Животные, перед инъекцией получавшие SkQ1 с питьевой водой, характеризовались значительно более низким уровнем глюкозы, равным в среднем 7,43 ммоль/л. Интересно отметить, что обратная процедура – когда SkQ1 давался животным после инъекции аллоксана – подобного эффекта не оказывала, что, по-видимому, связано с развитием необратимых изменений после воздействия аллоксана на клетки поджелудочной железы. Таким образом, анализ экспрессионной регуляции механизмов свободного окисления и защиты от АФК в комплексе с изучением характера развития гипергликемии в ответ на пре-терапию митохондриально-направленным антиоксидантом демонстрируют протекторный эффект SkQ1 на клетки поджелудочной железы крысы в условиях аллоксанового диабета. Подобный эффект может быть объяснен усилением антиоксидантного статуса β -клеток и противодействием токсическому влиянию аллоксана.

2.2.1.4. Эксперименты на изолированных митохондриях

Для поиска способа инактивации, губительных для клетки АФК, нами было выбрано вещество SkQ1, которое является искусственно синтезированным антиоксидантом, способным проникать сквозь митохондриальную мембрану. Были изучены респираторные характеристики изолированных митохондрий печени крыс с экспериментальным диабетом в условиях предварительной терапии SkQ1. Исследовали следующие параметры:

1. Состояние 4` по Чансу (высокое содержание в среде инкубации субстратов — 5 mM пирувата и 5 mM малат (субстраты I комплекса).
2. Состояние 3 по Чансу (условия те же, что и при определении Состояния 4` по Чансу, но в присутствии 200 мкМ АДФ; при этом фактором, лимитирующим скорость реакции, является сама дыхательная цепь).
3. Скорость дыхания в присутствии разобшителя – 2,4-динитрофенола(ДНФ) (условия те же, что и при определении Состояния 4` по

Чансу, но в присутствии разобщителя окисления и фосфорилирования - 50 мкМ 2,4-динитрофенола). Кроме того, оценивали дыхательный контроль, представляющий собой отношение состояния 4' по Чансу к состоянию 3 по Чансу.

В результате экспериментов выяснилось, что ингибирования дыхательной цепи не происходит несмотря на гипергликемию. Скорость дыхания в присутствии разобщителя, наоборот, возрастает на 57% по отношению к контролю, что, по-видимому, говорит о повышении активности пируват дегидрогеназы и цитохрома С. Также происходит повышение скоростей дыхания в состояниях 4' и 3 по Чансу, на 72% и 23%, соответственно, из чего можно сделать вывод, что в присутствии SkQ1 в клетке происходит сброс мембранного потенциала – «мягкое» разобщение, защищающее клетку от пагубного воздействия аллоксана (АФК).

Таблица 3.

Сравнительные характеристики изолированных митохондрий в присутствии субстратов пируват (5мМ), малат (5мМ).

Потребление кислорода нмоль $O^2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$	Диабет	Диабет+SkQ
Состояние 4' по Чансу	16,8±1,4	38,6±3,5
Состояние 3 по Чансу	54,6±3,5	86,9±6,8
Скорость дыхания в присутствии ДНФ	63,7±6,9	128,5±8,2

Таблица 3 (продолжение).

Сравнительные характеристики изолированных митохондрий в присутствии субстратов пируват (5мМ), малат (5мМ).

Дыхательный контроль	3,5±0,4	2,5±0,1
Дыхательный контроль максимальный	4,1±0,6	3,3±0,2

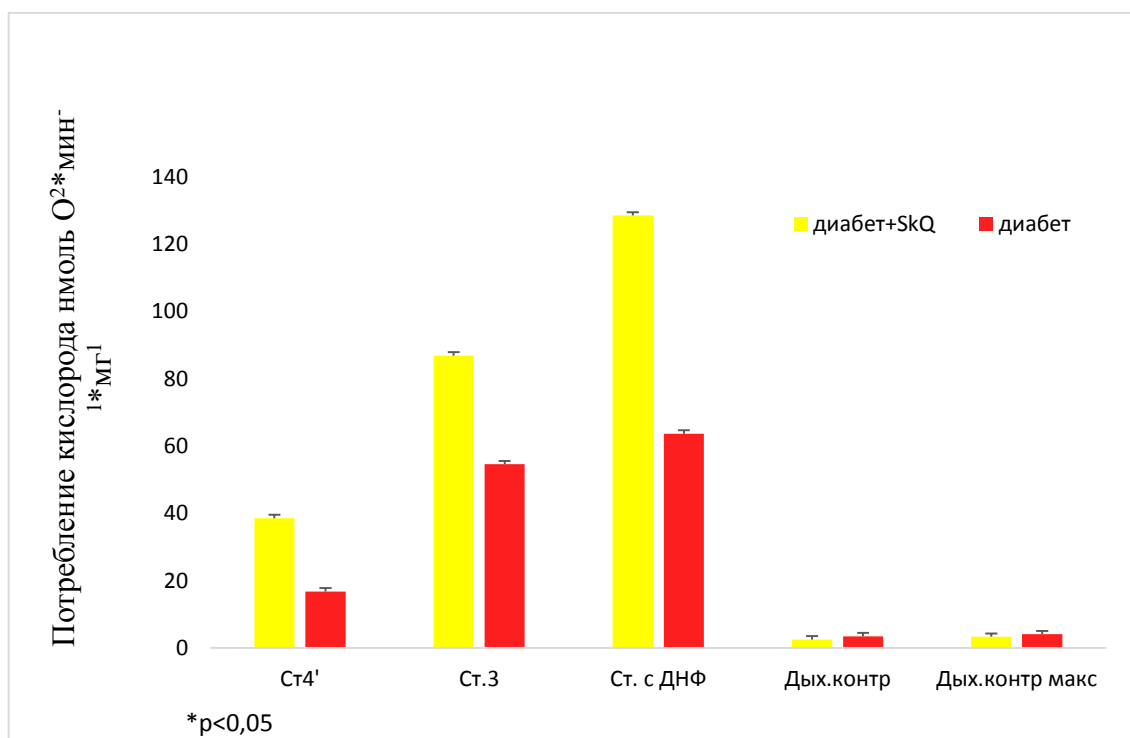


Рис. 13. Сравнение дыхательных характеристик изолированных митохондрий.

Снижение интенсивности дыхания указывает на уже сложившуюся патологию печени, когда компенсаторные механизмы в клетке практически истощены и преобладают процессы деградации. Предварительное применение митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 снижает выработку АФК, тем самым реанимируя электрон-транспортную цепь митохондрий, предотвращая развитие патологии.

Определение скорости образования пероксида водорода было выполнено флюорометрическим методом. В рамках данного эксперимента был смоделирован процесс разобщения дыхания жирной кислотой, как одного из способов «сброса» трансмембранного потенциала-пальмитатом (рис. 14).

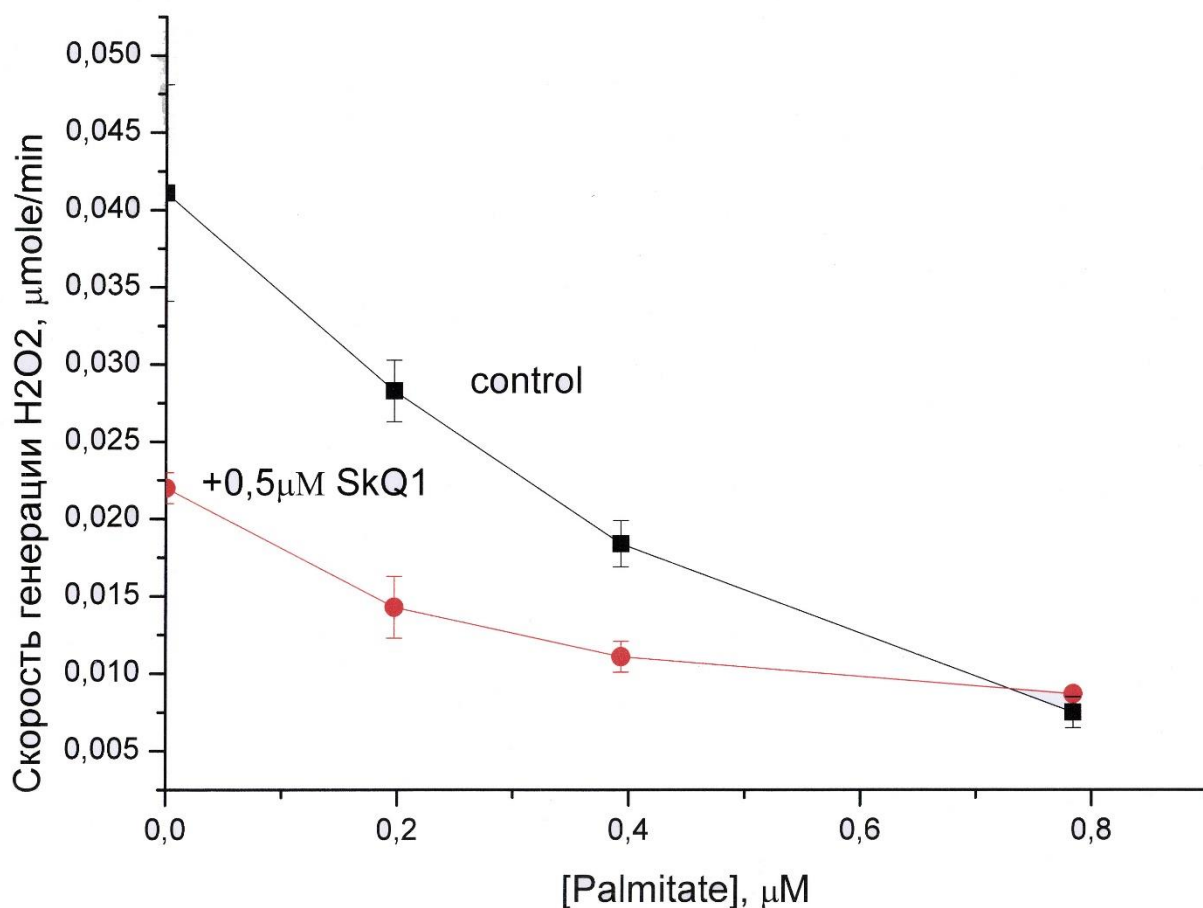


Рис. 14. Скорость генерации перекиси водорода при разобщении пальмитатом.

Показано, что в образце, содержащем препарат SkQ1, скорость образования пероксида водорода ниже, чем в контроле, что объясняется антиоксидантными свойствами препарата.

Затем была измерена интенсивность образования пероксида водорода при различных концентрациях SkQ1 (рис. 15.).

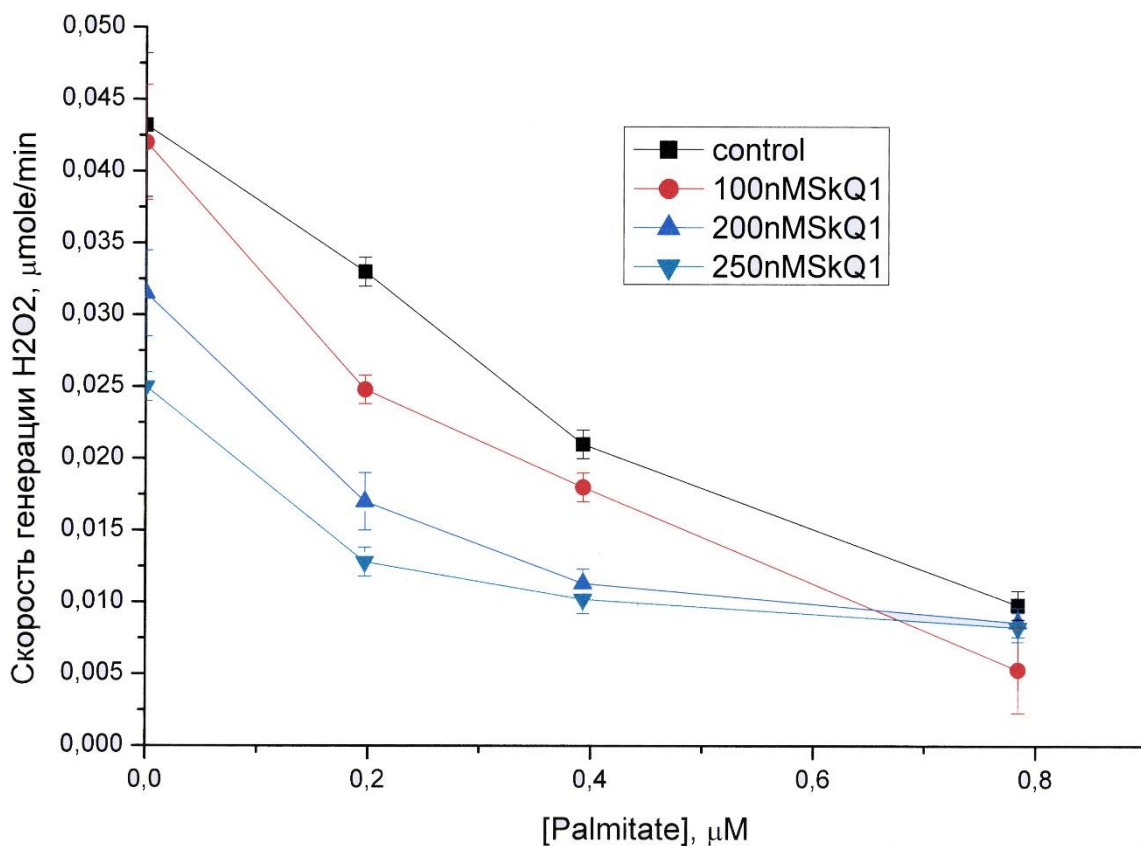


Рис. 15. Скорость генерации H_2O_2 при различных концентрациях SkQ1.

Далее была определена скорость генерации пероксида водорода в митохондриях крыс из четырех экспериментальных групп (контроль, диабет, SkQ1+диабет, SkQ1). Для измерения использовались митохондрии из различных органов (печень, почки), в качестве субстрата для дыхания в кювету добавляли $5\mu\text{l}$ 1М сукцината. Все измерения проводились в пятикратной повторности, данные представленные на графиках, есть среднее значение из пяти.

Таблица 4.

Скорость генерации перекиси водорода митохондриями почек.

Аллоксан (mkM/min*mg белка)	Аллоксан+SkQ1 (mkM/min*mg белка)	SkQ1 (mkM/min*mg белка)	Контроль (mkM/min*mg prot)
0,06213	0,0463	0,03404	0,0436
0,06115	0,0387	0,03612	0,04265
0,05462	0,0496	0,03265	0,0385
0,05783	0,0456	0,02595	0,03795
0,05325	0,04815	0,02766	0,0388
ср. знач.			
0,05769	0,04723	0,03085	0,04123

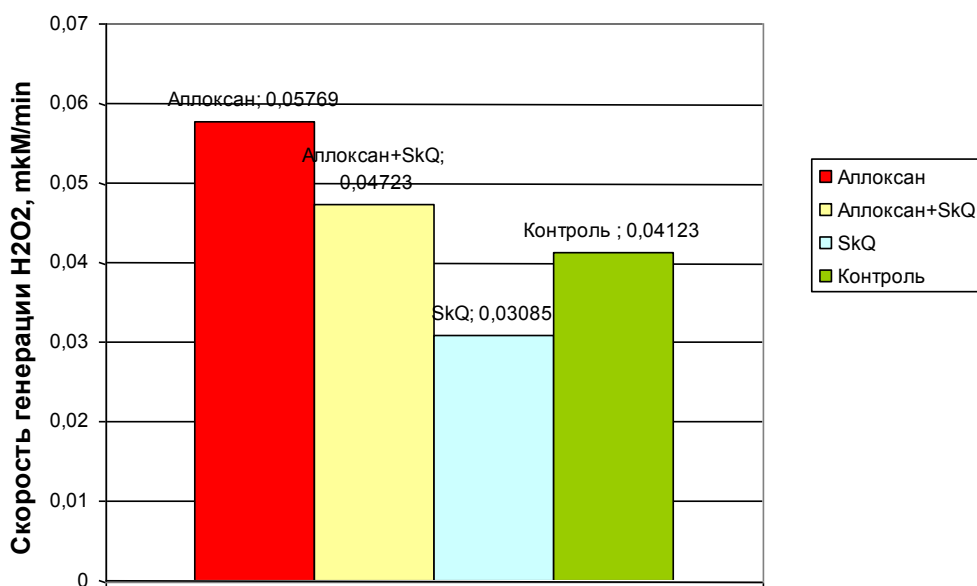
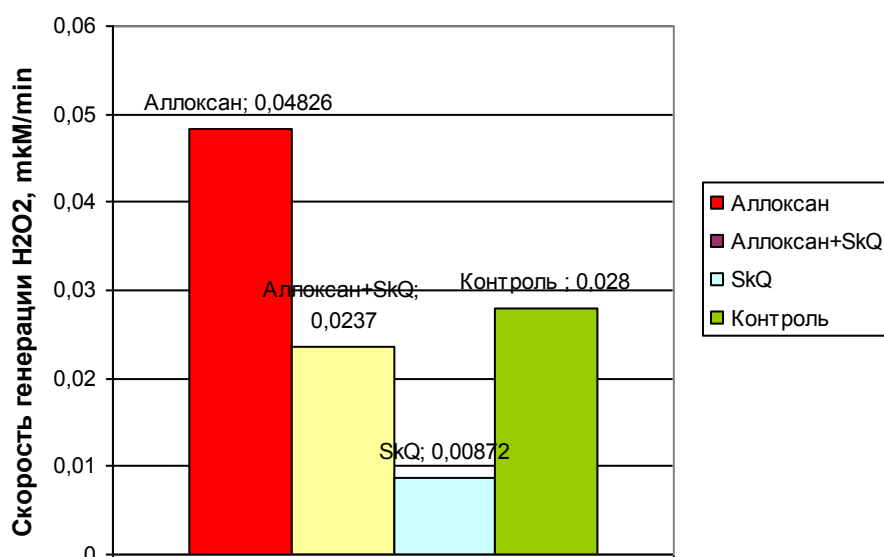
Рис. 16. Скорость генерации H₂O₂ в митохондриях почек крыс различных экспериментальных групп.

Таблица 5.

Скорость генерации перекиси водорода митохондриями печени.

Аллоксан (mkM/min*m g prot)	Аллоксан+SkQ1 (mkM/min*mg prot)	SkQ1 (mkM/min* mg prot)	Контроль (mkM/min*m g prot)
0,04783	0,02289	0,00911	0,0314
0,05023	0,0265	0,00923	0,0313
0,04956	0,02123	0,00856	0,0302
0,04523	0,01974	0,00812	0,0225
0,0487	0,02451	0,00833	0,0245
ср. знач.			
0,04826	0,0237	0,00872	0,028

Рис. 17. Скорость генерации H₂O₂ в митохондриях печени крыс различных экспериментальных групп.

Уровень продукции АФК максимален в респираторном состоянии 4, причем образование радикалов усиливается в то время как поток электронов приводит к высокому потенциалу путем генерации АТФ. Хотя митохондрии

в естественных условиях редко находятся в этом состоянии, предполагается, что митохондрии при сахарном диабете, при воздействии высоких концентраций глюкозы и жирных кислот, могут быть подвержены большему использованию кислорода и более высокому потенциалу, тем самым формируя больше АФК. В состоянии 4 митохондрии печени или сердца 2% потребляемого кислорода направляют на производство АФК.

При аллоксановом диабете у крыс повышается скорость образования перекиси водорода в разных органах, что свидетельствует о том, что при сахарном диабете происходит активация образования активных форм кислорода и в частности пероксида водорода. Печень характеризуется более значительным увеличением продукции перекиси – там при экспериментальном диабете происходит увеличение продукции перекиси митохондриями почти в 2 раза относительно контроля. При приёме животными препарата, содержащего антиоксидант SkQ1, наблюдается снижение скорости образования АФК в 0,6-0,3 раза, что говорит об эффективности препарата. В случае, когда крысы принимали препарат с антиоксидантом, а затем вводился аллоксан, наблюдается снижение уровня скорости генерации перекиси водорода до уровня контроля, что так же является подтверждением антиоксидантных свойств препарата содержащего SkQ1.

Проведя корреляцию между различными органами, можно сделать вывод, что наибольшей скоростью образования АФК обладают почки, что, скорее всего, ассоциировано с тем, что почки в организме выполняют функцию детоксикации и выведения ненужных и вредных для организма метаболитов. В поджелудочной железе интенсивность образования перекиси водорода оказалась ниже, чем в почках и печени.

2.2.2. Изучение светлоклеточного ПКР

2.2.2.1. Снижение уровня генной экспрессии окислительных метаболических путей при светлоклеточном раке почки

Главным побочным продуктом метаболизма являются активные формы кислорода (АФК), избыточное образование которых ведет к окислительному стрессу. В состоянии непрерывного и интенсивного образования АФК степень окислительного повреждения ДНК становится более значительной, что ведет к возникновению геномной нестабильности и увеличивает риск опухолевой трансформации [24]. Делящиеся в аэробных условиях клетки используют глюкозу и глутамин для продукции энергии, гипоксические клетки шунтируют глюкозу на лактат и переключают метаболизм глутамина. Глутамин может быть использован в цикле Кребса независимо от глюкозы или участвовать в синтезе липидов посредством восстановительного карбоксилирования кетоглутарата, образуемого из глутамина (с помощью изоцитрат дегидрогеназы) [37]. Окислительный стресс, возникающий вследствие подобных вышеописанному перестроек метаболизма раковой клетки, меняет ее (клетки) способность обращаться с АФК. Учитывая сигнальную роль АФК и связь антиоксидантного статуса раковой клетки с резистентностью к терапии, исследование метаболических основ рака почки позволит разработать эффективные инструменты диагностики и терапии. В данном исследовании использовались ДНК-микрочипы Affymetrix® Human Gene ST 1.1 и система анализа Affymetrix® GeneAtlas®. Гибридизацию проводили в течение 16 часов при температуре 48 °С. Проявление и сканирование микрочипов проводили на станции GeneAtlas® Imaging Station. Для обработки данных микрочипов, фильтрации фоновых шумов и усреднения значений интенсивности свечения проб по алгоритму RMA и построения списка дифференциально экспрессирующихся генов использовалось программное обеспечение (ПО)

Partek Genomics Suite 6.6. Полученные конечные значения дифференциальной экспрессии уровня генов передавались в ПО Ingenuity Pathway Analysis для определения метаболических и сигнальных путей, измененных в данной выборке. Дифференциальная экспрессия генов вычислялась как попарно (опухоль-норма для одного пациента), так и по всей выборке.

Экспрессия 1140 генов в опухолевых тканях была изменена более чем в 3 раза с уровнем значимости $p < 0.05$ с поправкой на среднюю долю ложных отклонений. Значения дифференциальной экспрессии некоторых наиболее активных генов приведены в табл. 6 и 7.

Таблица 6.

10 генов с наибольшим значением увеличения экспрессии при светлоклеточном ПКР.

Название	ID гена (NCBI Gene)	Изменение уровня экспрессии (количество раз)	p-value
<i>TNFAIP6</i>	7130	34,097	4,18E-05
<i>ANGPTL4</i>	51129	24,235	0,0001
<i>ANGPT2</i>	285	23,692	0,0015
<i>SERPINE1</i>	5054	22,115	0,0006
<i>CP</i>	1356	20,981	5,25E-05
<i>VCAN</i>	1462	20,278	2,99E-05
<i>HILPDA</i>	29923	19,961	0,005
<i>IDO1</i>	3620	17,585	5,51E-06
<i>VWF</i>	7450	16,765	0,0010
<i>C3</i>	718	15,503	3,56E-07

Наибольшим увеличением экспрессии характеризовался ген *TNFAIP6*. Содержание его мРНК в почках при скПКР было в 34 раза выше по сравнению с контролем. Белок, который кодируется этим геном, является секреторной молекулой, содержащей гиалуронан-связывающий домен, и, таким образом, является представителем семейства гиалуронан-связывающих белков. Этот белок формирует стабильный комплекс с интеральфа-ингибитором I (I alpha I), тем самым повышая серинпротеазную ингибирующую активность I alpha I, что важно в протеазном каскаде, связанным с воспалением. Этот ген может быть индуцирован провоспалительными цитокинами, таких как фактор некроза опухоли альфа и интерлейкином-1 [125]. Повышенный уровень этого белка обнаруживается в синовиальной жидкости пациентов с остеоартритом и ревматоидным артритом.

Ген *ANGPTL4*, экспрессия которого повышена в почках раковых пациентов, в 24,2 раза, кодирует гликозилированный секретлируемый белок, содержащий на С-конце фибриногеновый домен. Ангиопоэтин-подобный белок 4 индуцируется активаторами пролиферации пероксисом и функционирует как регулятор гомеостаза глюкозы, метаболизма липидов и чувствительности к инсулину.

Для успешной прогрессии любой опухоли необходимы сопутствующие процессы ангиогенеза. Показано, что при ПКР наблюдается оверэкспрессия гена ангиопоэтина 2 (в 23,7 раза). Помимо участия в снабжении кровеносными сосудами опухоли почек этот белок принимает участие в ангиогенезе, ассоциированном с миеломой [9].

Показано, что в 22 раза возрастает экспрессия *Serpine1*, гена, кодирующего молекулу-представитель суперсемейства ингибиторов сериновых протеаз, а именно ингибитор тканевого активатора плазминогена (tPA). SERPINE1 (PAI), таким образом, является ингибитором фибринолиза. Протеолитическая деградация внеклеточного матрикса и базальной мембраны является необходимым условием для роста опухоли, инвазии и

метастазирования. Метастазы рака зависят от совместного действия нескольких протеолитических ферментов, таких как коллагеназы, металлопротеиназы и сериновые протеазы, включая плазмин [8]. Плазмин является ключевым ферментом в этом процессе. Ингибитор активатора пламиногена-1 (РАI-1) является специфическим ингибитором активности пламина и может тем самым модулировать миграцию клеток и инвазию. РАI-1 экспрессируется в инвазивных районах многих видов рака. Существуют клинические доказательства ключевой роли РАI-1 в опухолевой инвазии и метастазировании. Аномальная экспрессия *Serpine1* также наблюдалось при различных видах заболеваний человека, включая атеросклероз, ишемическую болезнь сердца, сепсис, почечные и легочные фиброзы, ожирение и инсулинорезистентность [8].

Повышенная экспрессия гена церулоплазмينا (СР) может служить индикатором повреждения тканей. В нашем эксперименте при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме почти в 21 раз возрастает экспрессия *Ср*. Церулоплазмин является реакционной молекулой острой фазы, которая синтезируется и секретируется печенью, а также моноцитами/макрофагами, и участвует в метаболизме железа и меди. Показаны как антиоксидантная, так и проокислительная активности СР, что свидетельствуют о роли СР в регуляции гомеостаза NO [89]. В ряде исследований также показана связь уровня СР с повышенным риском возникновения сердечно-сосудистых заболеваний.

Продукт гена *Vcan* – белок семейства протеогликанов, один из главных компонентов внеклеточного матрикса. Показано, что экспрессия *Vcan* при ПКР возрастает в 20,3 раза, что, по-видимому, может являться маркером повреждения почек. Так, показано, что повышенная экспрессия *Vcan* в почках связана с развитием хронической болезни почек [144].

Таблица 7.

10 генов с наибольшим значением уменьшения экспрессии при светлоклеточном ПКР.

Название	ID гена (NCBI Gene)	Изменение уровня экспрессии (количество раз)	p-value
CALB1	793	-190,118	8,41E-08
HPD	3242	-134,992	1,16E-07
SLC36A2	153201	-125,846	5,86E-08
KNG1	3827	-124,505	1,10E-08
SLC22A8	9376	-119,606	4,60E-08
PAH	5053	-117,063	5,83E-07
UMOD	7369	-93,706	8,15E-06
SLC12A3	6559	-90,867	1,41E-10
SLC34A1	6569	-79,441	1,48E-07
XPNPEP2	7512	-78,086	4,74E-08

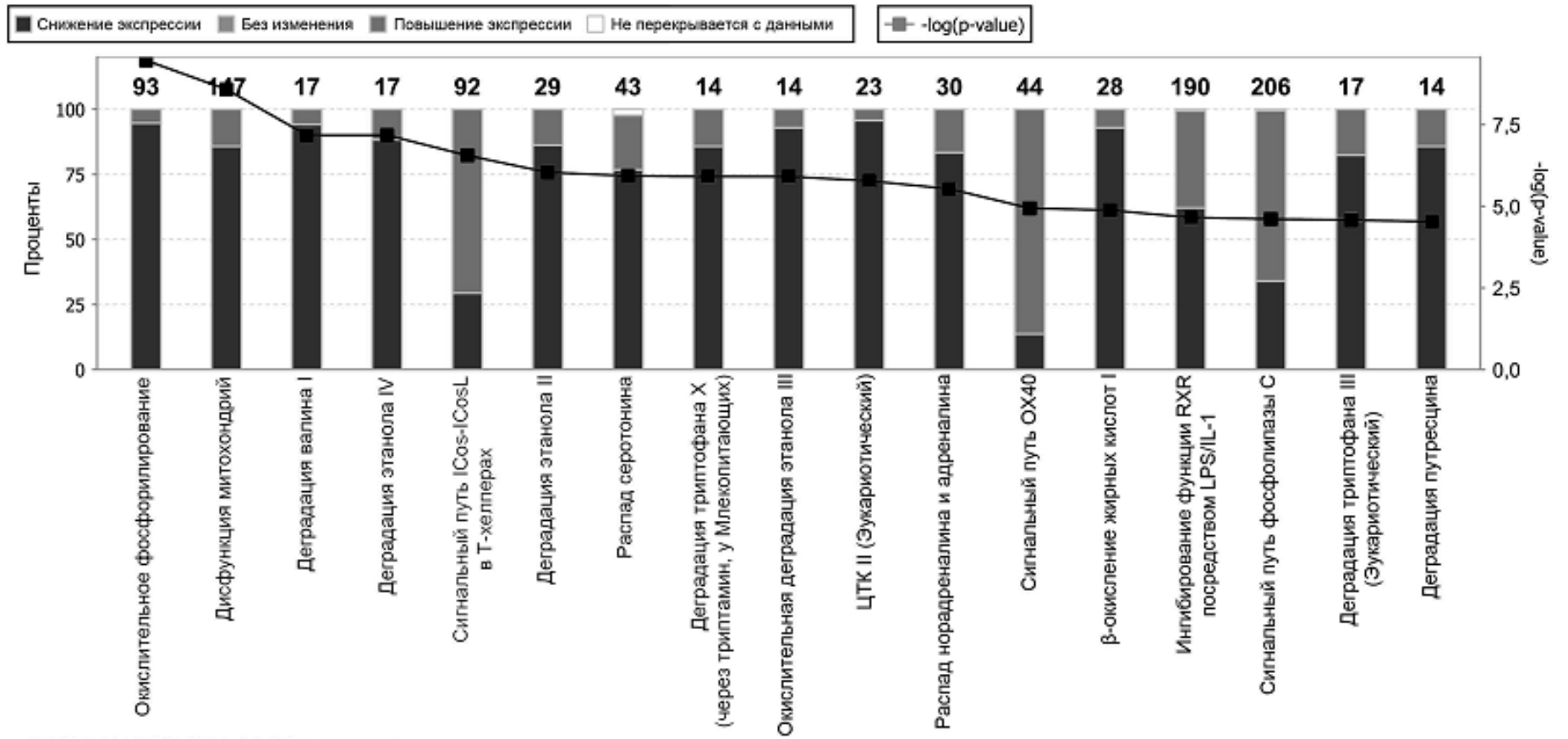
В результате полнотранскриптомного анализа экспрессии оказалось, что ген кальбиндина-1 характеризуется наибольшей выраженностью отрицательной регуляции. Его экспрессия снижается при ПКР в 190 раз. Белок CALB1 является членом суперсемейства кальций-связывающих белков, которое включает кальмодулин и тропонин С. Этот белок, как полагают, служит буфером ввода кальция в ответ на стимуляцию глутаматных рецепторов, а снижение количества мРНК гена *Calb1* наблюдается при различных патологиях [47].

Ген *Umod*, кодирующий уромодулин, снижает экспрессию почти в 94 раза в условиях светлоклеточной почечно-клеточной карциномы. Продукт экспрессии гена – самый распространенный белок в моче Млекопитающих,

выполняющий гомеостатические и защитные функции. Дефекты гена *Umod* ассоциированы с целым рядом патологий почек [41].

Несколько генов метаболизма аминокислот, *Hpd* (ген 4-гидроксифенилпируват диоксигеназы) и *Pah* (ген фенилаланин гидроксилазы) характеризуются пониженной экспрессией (135 и 117 раз, соответственно). Следует отметить, что и при ПКР, и при аллоксановом диабете в числе генов с наибольшей отрицательной регуляцией есть группа генов ферментов, участвующих в метаболизме аминокислот. А ген *Pah* характеризуется ярко выраженной отрицательной регуляцией и при аллоксановом диабете.

Анализ массива данных с помощью IPA выявил следующие канонические пути как наиболее значимые: «окислительное фосфорилирование» ($-\log(p)=9,467$; содержащий 93 гена, 88 из которых характеризуются сниженной экспрессией (down-регуляция)), «митохондриальная дисфункция» ($-\log(p)=8,58$; 147 генов, 126 из которых имеют пониженный уровень экспрессии), метаболизм аминокислот объединил пути «деградация валина» ($-\log(p)=7,178$; 17 генов, 16 down-регулированы) и «деградация триптофана» ($-\log(p)=5,91$, 14 генов, 12 down-регулированы); «цикл трикарбоновых кислот» ($-\log(p)=5,778$; 23 гена, 22 down-регулированы), « β -окисление жирных кислот» ($-\log(p)=4,88$; 26 из 28 генов down-регулированы) (рис. 18).



© 2000-2015 QIAGEN. All rights reserved.

Рис. 18. Наиболее значимые метаболические пути, выявленные с помощью Ingenuity Pathway Analysis (-log(p-value) которых больше 4,5).

Метаболические пути в нашем исследовании в основном были представлены реакциями метаболизма углеводов, липидов, аминокислот, энергетического метаболизма, таким образом, позиционируя светлоклеточный рак почки как метаболическое заболевание (таблица 8).

Таблица 8.

Общие значимые метаболические пути, полученные от 6 наборов данных с помощью мета-анализа.

Название метаболического пути	- log(p-value)	Количество экспрессирующихся генов	Преобладающий тип регуляции
Окислительное фосфорилирование	9,47	93	down
Дисфункция митохондрий	8,58	147	down
Деградация валина I	7,18	17	down
Деградация этанола IV	7,18	17	down
Сигнальный путь ICos-ICosL	6,555	92	up
Распад серотонина	5,931	43	down
Деградация триптофана X	5,91	14	down
Цикл трикарбоновых кислот II (эукариотический)	5,778	23	down

Таблица 8 (продолжение).

Общие значимые метаболические пути, полученные от 6 наборов данных с помощью мета-анализа.

β-окисление жирных кислот I	4,88	28	down
Сигнальный путь фосфолипазы C	4,61	206	up
Деградация триптофана III (эукариотический путь)	4,58	17	down
Апоптоз	3,03	79	up
Сигнальный путь TNFR1	2,88	44	up
Биосинтез NAD II	2,77	12	Смешанная регуляция
Диабет 1 типа	2,73	92	up
Деградация супероксида	2,53	6	down

Метаболическое перепрограммирование является одним из признаков рака [62]. В частности, в ряде исследований было показано, что изменения метаболизма раковой клетки ориентированы не на максимизацию производства АТФ, а скорее на обеспечение строительными блоками, необходимыми для поддержания макромолекулярного синтеза [166]. Сдвиг окислительного метаболизма в сторону гликолиза на фоне ухудшения митохондриального окислительного метаболизма происходит в условиях активации факторов, индуцируемых гипоксией (HIF) [81] и обеспечивает углерод и NADPH (через пентозофосфатный путь) для анаболизма. При ПКР, HIF1a перепрограммирует метаболизм раковых клеток, частично за

счет увеличения поглощения глюкозы, частично за счет контроля потока глюкозы путем гликолиза и пентозофосфатного пути.

Конститутивная активация факторов транскрипции HIF является основной движущей силой метаболического перепрограммирования при скПКР. Факторы транскрипции HIF активируют программу экспрессию генов, которая усиливает гликолитический поток, одновременно ингибируя активность митохондрий [152]. Способность HIF негативно регулировать активность митохондрий вписывается в эволюционную необходимость сопряжения потребления кислорода в митохондриях и доступности питательных веществ и кислорода. При скПКР содержание митохондрий содержимого обратно коррелирует со степенью развития опухоли, указывая на то, что подавление митохондриальной активности может играть важную роль в прогрессии скПКР [88].

Коактиваторы PPAR γ (PGC) представляют собой семейство коактиваторов транскрипции, которые регулируются различными экологическими стимулами и координируют митохондриальный биогенез и метаболический поток [115]. Коактиваторы PGC (PGC-1 α , PGC-1 β и PRC) проявляют различную степень избыточности, в то время как мыши-нокауты по PGC-1 α демонстрируют мульти-тканевые дефекты митохондриального метаболизма, что указывает на уникальные функции PGC-1 α [95]. Хотя все больше фактов указывает на важную роль PGC-1 α в развитии рака, существует дихотомия относительно про- и антиопухолеобразующего эффекта экспрессии PGC-1 α при различных типах рака.

На основании данных дифференциальной экспрессии генов нами построена схема регуляторных взаимодействий, отражающая функциональную нагрузку PGC-1 α при светлоклеточном ПКР и демонстрирующая взаимодействие между регуляторами и факторами транскрипции (рис. 19).

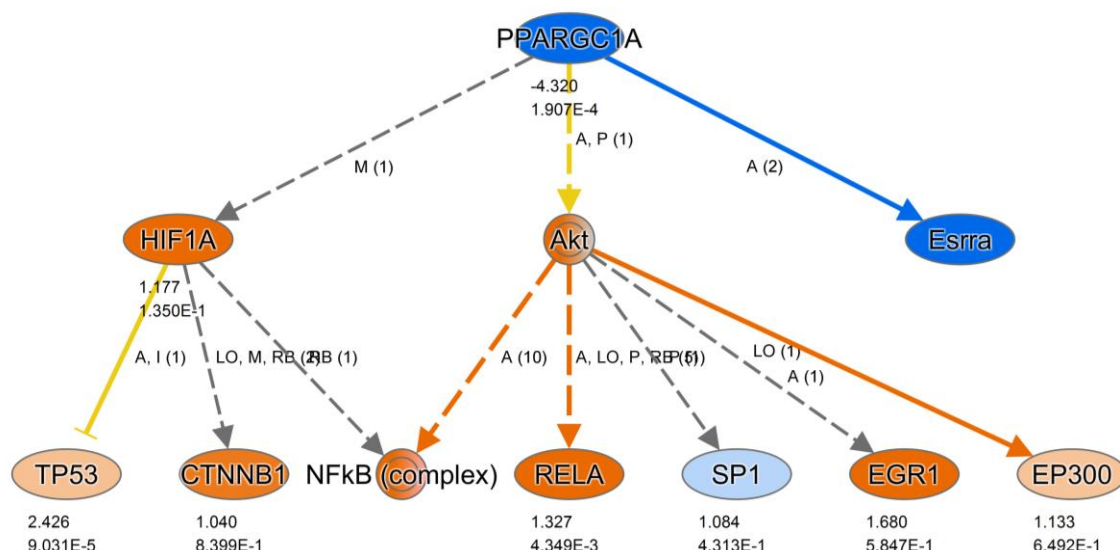


Рис. 19. Диаграмма метаболической регуляции при светлоклеточном ПКР, обусловленной активатором транскрипции PGC-1 α . Синим цветом показано предсказанное ингибирование, красным – активация; насыщенность цвета отражает степень достоверности эффекта.

В данных клинического скПКР экспрессия PGC-1 α уменьшается по сравнению с нормальными клетками коры почек, и низкий уровень PGC-1 α выражения ассоциируются с плохим исходом, указывая на то, что PGC-1 α способен подавлять процессы опухолеобразования при светлоклеточном почечно-клеточном раке. В недавнем исследовании было показано, что восстановленная экспрессия PGC-1 α увеличивает содержание митохондрий, продукцию АФК и окислительное повреждение, что приводит к нарушению роста опухоли и улучшению терапевтического ответа [95]. Опухоли почек, как правило, устойчивы к цитотоксической химиотерапии и радиотерапии, но индукция PGC-1 α может предоставить возможность для повышения эффективности и улучшения лечения скПКР. В будущем, важной задачей представляется определение, является ли фармакологическая активация PGC-1 α , за счет увеличения экспрессии PGC-1 α или активации

существующего пула эндогенных молекул PGC-1 α , является жизнеспособной терапевтической возможностью для лечения скПКР.

Известно, что ожирение и диета с преобладанием насыщенных жиров и холестерина, ассоциированы с развитием рака почки [15, 28]. Цикл трикарбоновых кислот – часть метаболического пути, сопряженного с митохондриальным окислительным фосфорилированием, который превращает питательные вещества в энергию в аэробных условиях. Основными биохимическими характеристиками RCC являются усиленное потребление глюкозы и активация гликолиза [53]. Пролиферация раковых клеток зависит от их способности получать питательные вещества, такие как нуклеотиды, липиды, аминокислоты, макромолекулы, для продукции АТФ и синтеза биомассы. Сдвиг окислительного метаболизма в сторону гликолиза на фоне ухудшения митохондриального окислительного метаболизма происходит в условиях активации факторов, индуцируемых гипоксией (HIF) [81] и обеспечивает углерод и NADPH (через пентозофосфатный путь) для анаболизма. Окислительный стресс, возникающий вследствие измененного метаболизма раковой клетки, меняет ее (клетки) способность обращаться с АФК, которые стабилизируют HIF. HIF контролируют метаболическую перестройку при светлоклеточном раке почки, осуществляя ряд важных активностей: 1) мутации в генах фумарат гидратазы и сукцинат дегидрогеназы активируют HIF, таким образом связывая ЦТК с опухолеобразованием в почках; 2) в гипоксических условиях, когда нарушен окислительный метаболизм, HIF переключают метаболизм от окислительного фосфорилирования на анаэробный гликолиз. HIF регулируют ЛДГ, которая обеспечивает регенерацию NAD⁺ для поддержания гликолитического потока; 3) HIF подавляют биогенез митохондрий; 4) HIF способствуют синтезу липидов посредством усиления потребления и синтеза ЖК через PPAR γ , а также синтезу гликогена. Кроме того, HIF может усиливать экспрессию фактора роста эндотелия сосудов

VEGF, переносчик глюкозы GLUT-1, таким образом играя важную роль в прогрессии злокачественной опухоли [75].

Анализ генной экспрессии на микрочипах представляет собой многообещающий метод, с помощью которого возможно классифицировать опухоли как между субтипами, так и в пределах одного субтипа. Так, например, мета-анализ в серии работ Brannon с соавторами позволил выделить в светлоклеточном раке почки два подтипа на основании различного характера профиля генной экспрессии: ссА и ссВ [14]. Интересно, что подтип ссВ характеризуется более «агрессивным» экспрессионным профилем. Показано, что гены, оверэкспрессия которых выявляется при данном подтипе светлоклеточного рака почки, ассоциированы с такими процессами, как регуляция клеточного цикла, заживление ран. Комбинация анализа генной экспрессии и анализа количества копий в исследовании Dondeti позволила выделить гены станниокальцина (*stc2*) и версикана (*vcan*) в качестве потенциальных онкогенов при светлоклеточном раке почки, так как в 30% исследованных случаев выявлены хромосомные aberrации, связанные с приобретением новых функций [43].

Недавний масштабный геномный анализ данных полноэкзомного секвенирования образцов 4742 пар опухоль-норма (tumor-normal, TN) среди 21 типа опухолей обосновал возможность применения такого подхода для комплексного анализа известных онкогенов и поиска новых. Удивительно, что всего 22 гена на основании анализа точечных мутаций были признаны значимыми в трех и более типах опухолей. Это известные *tp53*, *pik3ca*, *pten*, *rb1*, *kras*, *nras*, *braf*, *cdkn2a*, *fbxw7*, *arid1a*, *mll2*, *stag2*, а также *atm*, *casp8*, *ctcf*, *erbb3*, *hla-a*, *hras*, *idh1*, *nf1*, *nfe2l2*, *pik3r1* [96].

Рак почки - это в основе своей метаболическое заболевание. Известные гены, отвечающие за рак почки, *MET*, *FLCN*, *MITF*, *TFE3*, *TFEB*, *TSC1*, *TSC2*, *PTEN*, *FH*, *SDHB* и *SDHD*, участвуют в способности клетки воспринимать кислород, железо, питательные вещества и, особенно в случае

ферментов ЦТК, энергию. Большинство пациентов, получавших разрешенные препараты, ориентированные на ген *Vhl*, такие как сунитиниб, сорафениб, бемацузумаб и эверолимус, в конечном счете, лечились неудачно, и болезнь прогрессировала. Акцент на метаболической основе рака почки обеспечит возможность разработки эффективных форм терапии для всех пациентов с этим заболеванием.

Постепенное внедрение высокопроизводительных технологий привело к более глубокому пониманию молекулярных механизмов, лежащих в основе развития рака и выявлению новых потенциальных терапевтических мишеней. Делящиеся опухолевые клетки требуют большого количества питательных веществ для поддержания высоких темпов пролиферации. Для этого метаболизм раковой клетки претерпевает адаптивные изменения, которые включают в себя переход от окислительного фосфорилирования на гликолиз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен полнотранскриптомный анализ генной экспрессии β -клеток поджелудочной железы крыс *Rattus norvegicus* с экспериментальным диабетом 1 типа. В наибольшей степени отрицательно регулируемыми оказались гены белков-переносчиков, путей метаболизма углеводов аминокислот. Наибольшим уровнем экспрессии характеризовался ген *Car3*, кодирующий фермент карбоангидразу 3, в 95 раз возрастала экспрессия гена *Adipoq*. Среди генов со значительно сниженным уровнем экспрессии присутствуют также гены ферментативной системы защиты от АФК (*Gsta2* (-48), *Gpx2* (-40), *Gstt3* (-23), *Gsta4* (-22), *Gstp1* (-7,8), *Txnrd1* (-7,6), *Gsr* (-4), *Nqo1* (-7,5)), фактор транскрипции *Ppara*, регулирующий экспрессию генов метаболизма жирных кислот и играющий роль в регуляции секреции инсулина и детоксикации липидов [87] и компоненты ЭТЦ митохондрий (*Atpb1g3* (-7,65)). При диабете в клетках поджелудочной железы согласно данным полнотранскриптомного анализа генной экспрессии снижается экспрессия нескольких представителей цитохрома P450. Таким образом, наблюдается снижение антиоксидантного статуса β -клеток на фоне метаболических перестроек, затрагивающих метаболические пути углеводов, аминокислот, а также пути транспорта различных молекул.

В результате исследования экспрессии генов системы антиоксидантной защиты показано, что экспрессионный паттерн выбранных нами генов-мишеней имеет четко выраженный характер. Экспрессия почти всех генов снижается в условиях окислительного стресса при диабете. Так, экспрессия *Cat* при диабете ниже контрольного значения в 5,57 раз, *Gsr* – в 4,2 раза, *Gsta3* – в 1,9 раз, *Gstt* и *Hsp90aa1* – в 3,1 раза, *Prdx3* – в 2,98 раз, *Sod2* – в 4 раза. Различной степени выраженности снижение экспрессии генов ферментов защиты клетки от пагубного воздействия АФК может объясняться высоким содержанием окисленных

белков, липидов и ДНК при диабете, вследствие чего снижаются способности клетки к детоксикации свободных радикалов.

Изучено влияние пре-терапии SkQ1 на экспрессионную регуляцию некоторых генов-мишеней окислительного метаболизма в поджелудочной железе крыс с экспериментальным диабетом. В присутствии антиоксиданта SkQ1 уровни экспрессии практически всех изученных генов равнялись таковым в состоянии контроля. Экспрессия гена *Ucp2*, кодирующего митохондриальный белок-переносчик, возрастала в условиях окислительного стресса (диабета) примерно в 132 раза. При предварительной терапии SkQ1 экспрессия *Ucp2* снижалась в полтора раза относительно контроля. Предполагается, что активируемый окислительным стрессом *Ucp2*-зависимый ток протонов может быть фармакологически ингибирован, что впоследствии усилит секрецию инсулина и воспрепятствует дисфункции β -клеток [133]. Этим можно объяснить ингибирующий эффект SkQ1 на экспрессию *Ucp2*. SkQ1 нейтрализует возникающие в митохондриях АФК, в том числе активатор *Ucp2* – супероксид. Анализ экспрессионной регуляции механизмов свободного окисления и защиты от АФК в комплексе с изучением характера развития гипергликемии в ответ на пре-терапию митохондриально-направленным антиоксидантом демонстрируют протекторный эффект SkQ1 на клетки поджелудочной железы крысы в условиях аллоксанового диабета. Подобный эффект может быть объяснен усилением антиоксидантного статуса β -клеток и противодействием токсическому влиянию аллоксана.

Изучены респираторные характеристики изолированных митохондрий печени крыс с экспериментальным диабетом в условиях предварительной терапии SkQ1. Скорость дыхания в присутствии разобщителя возрастает на 57% по отношению к контролю, что говорит о повышении активности пируват дегидрогеназы и цитохрома С. При аллоксановом диабете у крыс повышается скорость образования перекиси водорода в разных органах, что свидетельствует о том, что при сахарном

диабете происходит активация образования АФК, в частности пероксида водорода. Печень характеризуется более значительным увеличением продукции перекиси – там при экспериментальном диабете происходит увеличение продукции перекиси митохондриями почти в 2 раза относительно контроля. При приёме животными препарата, содержащего антиоксидант SkQ1, наблюдается снижение скорости образования АФК в 0,6-0,3 раза, что говорит об эффективности препарата. В случае, когда крысы принимали препарат с антиоксидантом, а затем вводился аллоксан, наблюдается снижение уровня скорости генерации перекиси водорода до уровня контроля, что так же является подтверждением антиоксидантных свойств препарата содержащего SkQ1.

По результатам полнотранскриптомного анализа генной экспрессии образцов ткани почек пациентов с светлоклеточным ПКР Экспрессия 1140 генов в опухолевых тканях была изменена более чем в 3 раза с уровнем значимости $p < 0.05$ с поправкой на среднюю долю ложных отклонений. Делящиеся опухолевые клетки требуют большого количества питательных веществ для поддержания высоких темпов пролиферации. Для этого метаболизм раковой клетки претерпевает адаптивные изменения, которые включают в себя переход от окислительного фосфорилирования на гликолиз. Сдвиг окислительного метаболизма в сторону гликолиза на фоне ухудшения митохондриального окислительного метаболизма происходит в условиях активации факторов, индуцируемых гипоксией (HIF), которые могут регулироваться фактором транскрипции PGC-1 α . На основании данных дифференциальной экспрессии генов нами установлена возможная схема такой регуляции.

Взаимосвязь между диабетом и раком довольно существенна, поскольку в настоящее время считается, что может существовать "общая почва", отвечающими за развитие этих патологий. Другими словами, некоторые факторы риска для диабета аналогичным образом делают людей более восприимчивыми к раку. Есть также многочисленные

эпидемиологические исследования, посвященные взаимосвязи между сахарным диабетом и ПКР, наблюдается повышенный онкологической заболеваемости и смертности у пациентов с диабетом [182, 185]. Таким образом, заболеваемость ПКР и смертность повышаются у пациентов с сахарным диабетом по сравнению с общей популяцией. Этой общей почвой может быть состояние окислительного стресса на фоне снижения общей активности митохондрий. Метаболические пути в нашем исследовании в основном были представлены реакциями метаболизма углеводов, липидов, аминокислот, энергетического метаболизма, таким образом, позиционируя светлоклеточный рак почки как метаболическое заболевание подобно сахарному диабету. Результаты анализа активности метаболических путей, обусловленной дифференциальной экспрессией генов, выявили центральную роль митохондриального метаболизма при скПКР (рис. 20).

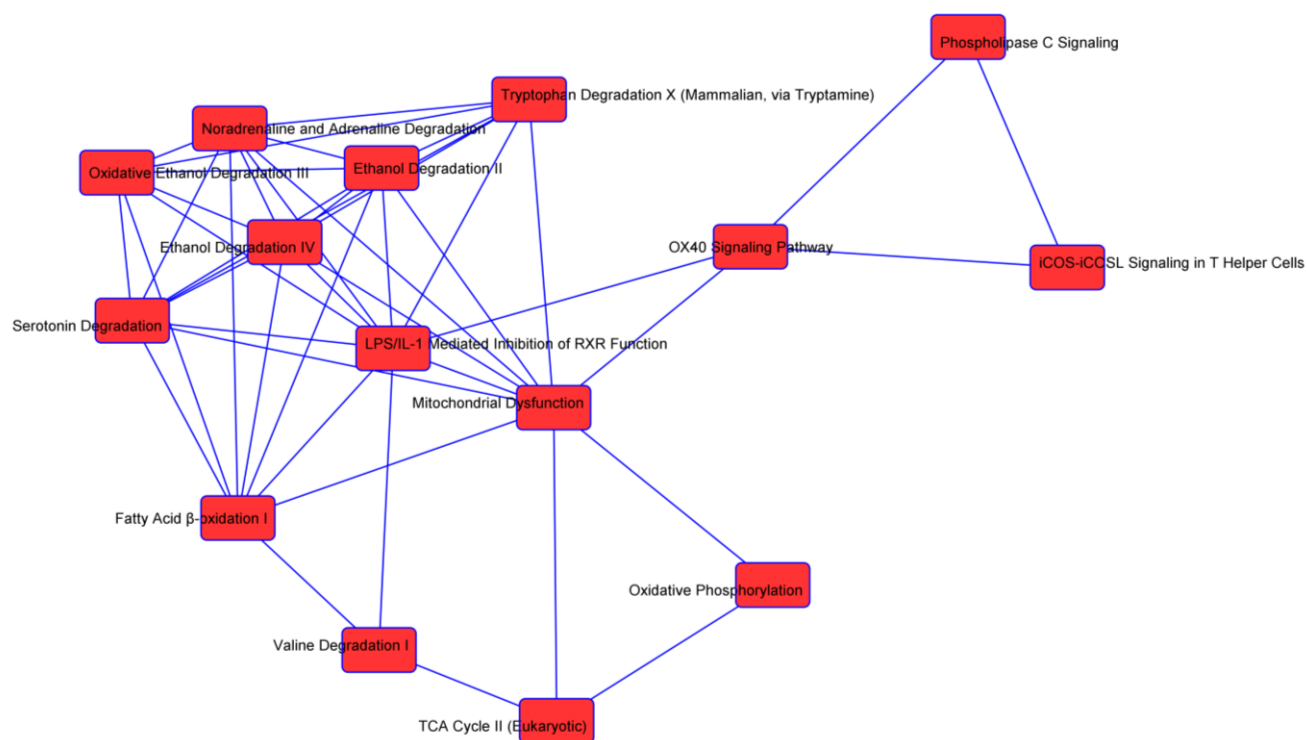


Рис. 20. Диаграмма наиболее активных метаболических путей при скПКР, построенная на основании данных дифференциальной экспрессии генов.

В центре схемы находится «дисфункция митохондрий», которая характеризуется наибольшим количеством взаимосвязей с другими метаболическими и сигнальными путями в клетках почек. Таким образом, рак почки явно представляется комплексным метаболическим заболеванием.

В условиях экспериментального сахарного диабета 1 типа и светлоклеточной почечно-клеточной карциномы различными методами показана активная вовлеченность окислительных процессов в развитие патологий. Для аллоксанового диабета показана возможность коррекции последствий окислительного стресса с помощью предварительной терапии антиоксидантом SkQ1. Примечательно, что в настоящее время обсуждается возможный терапевтический эффект антидиабетогенных препаратов на

развитие онкозаболеваний [46], что укрепляет представление о существовании общего метаболического фундамента в развитии диабета и злокачественных опухолей. Этим фундаментом, по-видимому, являются нарушения митохондриального метаболизма – дефекты транспортных систем, компонентов окислительного фосфорилирования, биогенеза органелл. Полученные нами результаты исследования регуляции процессов окислительного фосфорилирования при экспериментальном диабете и светлоклеточной почечно-клеточной карциноме выявили общие закономерности развития этих патологий и позволили составить гипотетическую схему регуляции окислительного фосфорилирования при раке почек на примере выборки представителей российской популяции (рис. 21). На схеме ромбами с розовыми границами обозначены молекулы, дифференциальная экспрессия которых была обнаружена в ходе анализа. Не имеющие границ обозначения соответствуют молекулярным мишеням, участвующим в данном метаболическом пути, но отсутствующим в массиве данных. Окраска ромба соответствует типу регуляции молекулы (зеленый – снижение экспрессии, красный – увеличение), а интенсивность окраски – степени изменения экспрессии.

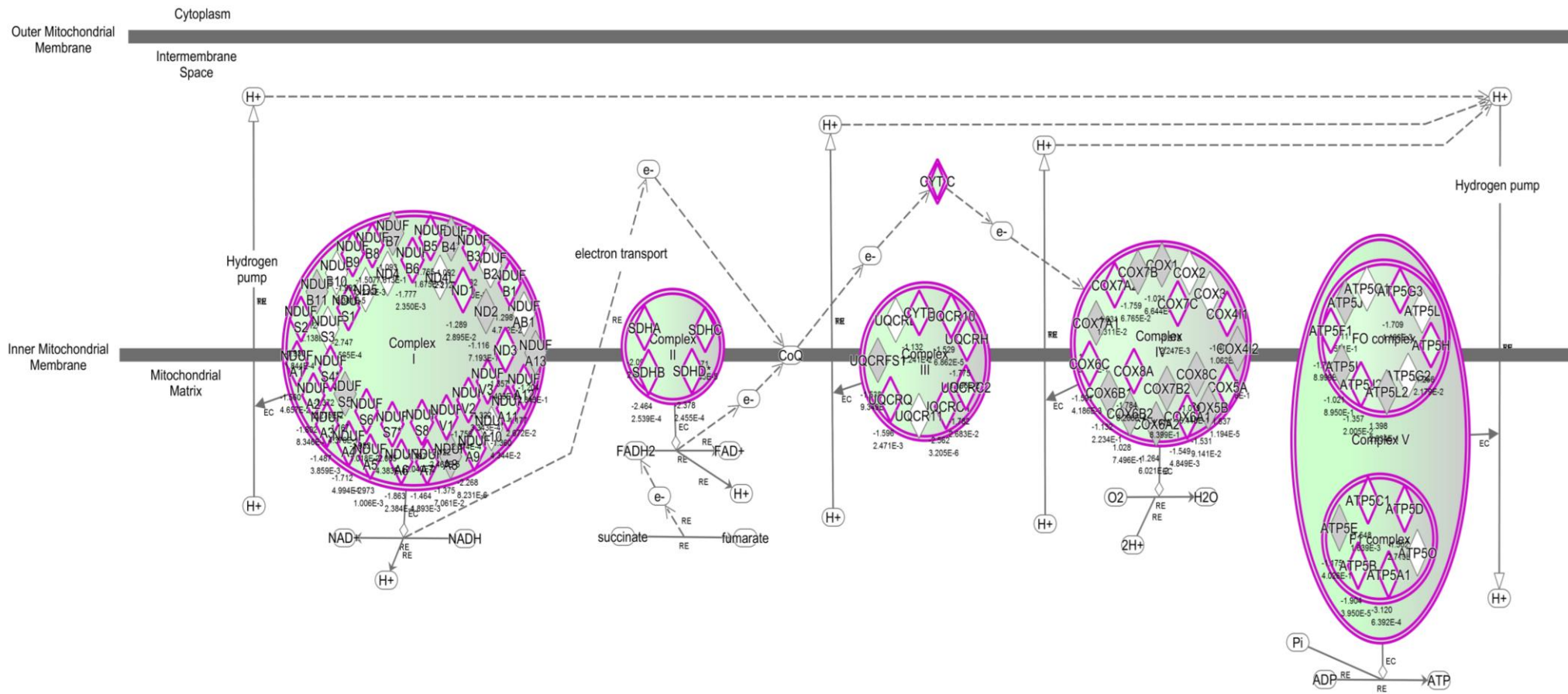


Рис. 21. Гипотетическая схема организации и регуляции процессов окислительного фосфорилирования при скПКР.

ВЫВОДЫ

1. Проведен полнотранскриптомный анализ генной экспрессии поджелудочной железы крыс с экспериментальным диабетом и почек пациентов с светлоклеточным ПКР. Выявлены массивы генов с дифференциальной экспрессией и отобраны мишени для последующей их валидации методом qPCR.
2. Оценено функциональное состояние системы защиты от АФК клеток поджелудочной железы крыс при диабете. Установлено, что экспрессия генов белков-компонентов системы антиоксидантной защиты снижается на фоне увеличения экспрессии генов NO-синтазы.
3. Изучено влияние предварительной терапии митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 на профиль экспрессии генов окислительного метаболизма при развитии экспериментального диабета у крыс. Показано, что аномально высокие уровни экспрессии генов при диабете снижаются вследствие протекторного воздействия SkQ1 на клетки поджелудочной железы.
4. Изучен эффект предварительной терапии антиоксидантом SkQ1 на характер развития гипергликемии при аллоксановом диабете. Показано, что SkQ1 демонстрирует протекторный эффект, который выражается в значительном снижении содержания глюкозы в крови после администрирования диабетогенного аллоксана.
5. Оценены респираторные характеристики изолированных митохондрий печени крыс в ответ на пре-терапию диабета антиоксидантом SkQ1. При индуцированном инсулиннезависимом сахарном диабете происходит подавление дыхательной цепи. В присутствии SkQ1 в клетке происходит

сброс мембранного потенциала – «мягкое» разобщение, предохраняющее клетку от пагубного воздействия аллоксана.

6. Изучена продукция АФК митохондриями различных тканей крыс при аллоксановом диабете и в условиях предварительной антиоксидантной терапии препаратом SkQ1. Митохондрии печени характеризуются более активной генерацией перекиси водорода, чем митохондрии почек. SkQ1 снижает темпы продукции АФК изолированными митохондриями.
7. Установлена связь данных полнотранскриптомного анализа экспрессии генов с изменением активности метаболических путей при светлоклеточном ПКР. Метаболические пути были представлены реакциями метаболизма углеводов, липидов, аминокислот, энергетического метаболизма, таким образом, позиционируя светлоклеточный рак почки как метаболическое заболевание.
8. Выявлены биохимические метаболические пути, характеризующиеся наибольшей степенью изменения активности их компонентов при светлоклеточном ПКР. Наиболее активным изменениям подвергались окислительный метаболизм, пути биосинтеза и деградации аминокислот и жирных кислот, ЦТК.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Almanza-Perez J.C. [и др.]. Glycine regulates inflammatory markers modifying the energetic balance through PPAR and UCP-2 // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2010. (64). С. 534–540.
2. Alwan A. Global status report on noncommunicable diseases 2010. / A. Alwan, World Health Organization, 2011. 163 с.
3. Antico Arciuch V.G. [и др.]. Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. // *Antioxidants & redox signaling*. 2012. № 10 (16). С. 1150–80.
4. Arikawa E. [и др.]. Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. // *BMC genomics*. 2008. (9). С. 328.
5. Association A.D. Economic costs of diabetes in the US in 2012 // *Diabetes Care*. 2013. № 4 (36). С. 1033–46.
6. Atkinson M. a [и др.]. How does type 1 diabetes develop?: the notion of homicide or β -cell suicide revisited. // *Diabetes*. 2011. № 5 (60). С. 1370–9.
7. Balaban R.S., Nemoto S., Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. // *Cell*. 2005. № 4 (120). С. 483–95.
8. Bayramoglu A. [и др.]. Plasminogen activator inhibitor-1 and susceptibility to lung cancer: a population genetics perspective. // *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2014. № 8 (18). С. 587–90.
9. Belloni D. [и др.]. Angiopoietin-2 in Bone Marrow milieu promotes Multiple Myeloma-associated angiogenesis // *Experimental Cell Research*. 2015. № 1 (330). С. 1–12.

10. Borg L. a [и др.]. Effects in vitro of alloxan on the glucose metabolism of mouse pancreatic B-cells. // *The Biochemical journal*. 1979. № 3 (182). С. 797–802.
11. Brand M. The sites and topology of mitochondrial superoxide production // *Experimental gerontology*. 2010. (45). С. 466–472.
12. Brand M., Nicholls D. Assessing mitochondrial dysfunction in cells // *Biochem. J*. 2011. № 2 (435). С. 297–312.
13. Brand M.D. [и др.]. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. // *The Biochemical journal*. 2005. № Pt 2 (392). С. 353–62.
14. Brannon A.R. [и др.]. Meta-analysis of clear cell renal cell carcinoma gene expression defines a variant subgroup and identifies gender influences on tumor biology. // *European urology*. 2012. № 2 (61). С. 258–68.
15. Brock K.E. [и др.]. Dietary fat and risk of renal cell carcinoma in the USA: a case-control study. // *The British journal of nutrition*. 2009. № 8 (101). С. 1228–38.
16. Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism // *Diabetes*. 2005. № June (54). С. 1615–1625.
17. Bugger H. [и др.]. Type 1 diabetic akita mouse hearts are insulin sensitive but manifest structurally abnormal mitochondria that remain coupled despite increased uncoupling protein // *Diabetes*. 2008. № 11 (57). С. 2924–32.
18. Bustin S. a [и др.]. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. // *Clinical chemistry*. 2009. № 4 (55). С. 611–22.
19. Cairns P. Renal cell carcinoma. // *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2010. № 1-6 (9). С. 461–73.

20. Carter W.G. [и др.]. Isoaspartate, carbamoyl phosphate synthase-1, and carbonic anhydrase-III as biomarkers of liver injury. // *Biochemical and biophysical research communications*. 2015. № 3 (458). С. 626–31.
21. Ceretta L.B. [и др.]. Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats. // *Experimental diabetes research*. 2012. (2012). С. 302682.
22. Chan C.B. [и др.]. Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. // *Diabetes*. 1999. (48). С. 1482–6.
23. Chan C.B., Kashemsant N. Regulation of insulin secretion by uncoupling protein. // *Biochemical Society transactions*. 2006. № Pt 5 (34). С. 802–5.
24. Charames G.S., Bapat B. Genomic instability and cancer. // *Current molecular medicine*. 2003. (3). С. 589–596.
25. Chen J., Cammarata P. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications // *Biochimica et Biophysica* 2009. № 10 (1793). С. 1540–1570.
26. Chi A. [и др.]. Molecular characterization of kidney cancer // *Cancer*. 2012. № 9 (118). С. 2394–2402.
27. Chinnery P.F., Hudson G. Mitochondrial genetics. // *British medical bulletin*. 2013. (106). С. 135–59.
28. Chow W.H. [и др.]. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. // *The New England journal of medicine*. 2000. № 18 (343). С. 1305–11.
29. Chowdhury S., Zherebitskaya E. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in dorsal root ganglia of streptozotocin-induced diabetic rats and its correction by insulin treatment // *Diabetes*. 2010. № April (59).

30. Cline G. Fuel-stimulated insulin secretion depends upon mitochondria activation and the integration of mitochondrial and cytosolic substrate cycles // *Diabetes & metabolism journal*. 2011. № 5 (35). С. 458.
31. Cole M., Murray A., Cochlin L. A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart // *Basic research in ...*. 2011. № 3 (106). С. 447–57.
32. Courthod G. [и др.]. Papillary renal cell carcinoma: A review of the current therapeutic landscape. // *Critical reviews in oncology/hematology*. 2015.
33. Dai D.-F. [и др.]. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan // *Longevity & Healthspan*. 2014. № 1 (3). С. 6.
34. Dalgaard L.T. UCP2 mRNA expression is dependent on glucose metabolism in pancreatic islets. // *Biochemical and biophysical research communications*. 2012. № 1 (417). С. 495–500.
35. Danaei G. [и др.]. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. // *Lancet*. 2011. № 9785 (378). С. 31–40.
36. Daneman D. Type 1 diabetes. // *Lancet*. 2006. № 9513 (367). С. 847–58.
37. Dang C. V Links between metabolism and cancer. // *Genes & development*. 2012. № 9 (26). С. 877–90.
38. Davis V.W. [и др.]. Metabolomics and surgical oncology: Potential role for small molecule biomarkers. // *Journal of surgical oncology*. 2011. № 5 (103). С. 451–9.

39. Delmastro M.M., Piganelli J.D. Oxidative stress and redox modulation potential in type 1 diabetes. // *Clinical & developmental immunology*. 2011. (2011). С. 593863.
40. Dietrich M., Horvath T. The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan // *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2010. № 2 (459). С. 269–275.
41. Dinic M. [и др.]. UMOD polymorphism rs12917707 is not associated with severe or stable IgA nephropathy in a large Caucasian cohort // *BMC Nephrology*. 2014. № 1 (15). С. 138.
42. Donadelli M. [и др.]. UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013. С. 1–20.
43. Dondeti V.R. [и др.]. Integrative genomic analyses of sporadic clear cell renal cell carcinoma define disease subtypes and potential new therapeutic targets. // *Cancer research*. 2012. № 1 (72). С. 112–21.
44. El-Bab M.F. [и др.]. Diabetic retinopathy is associated with oxidative stress and mitigation of gene expression of antioxidant enzymes. // *International journal of general medicine*. 2013. (6). С. 799–806.
45. Elchuri S. [и др.]. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. // *Oncogene*. 2005. № 3 (24). С. 367–80.
46. Emami-Riedmaier A. [и др.]. Stratified medicine for the use of antidiabetic medication in treatment of type II diabetes and cancer: where do we go from here? // *Journal of Internal Medicine*. 2015. № 2 (277). С. 235–247.

47. Emmanuele V. [и др.]. Decreased hippocampal expression of calbindin D28K and cognitive impairment in MELAS // *Journal of the Neurological Sciences*. 2012. № 1-2 (317). С. 29–34.
48. Erlanson-Albertsson C. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. // *Acta physiologica Scandinavica*. 2003. № 4 (178). С. 405–12.
49. Figueira T.R. [и др.]. Enhanced insulin secretion and glucose tolerance in rats exhibiting low plasma free fatty acid levels and hypertriglyceridaemia due to congenital albumin deficiency. // *Experimental physiology*. 2012. № 4 (97). С. 525–33.
50. Fink B.D. [и др.]. UCP2-dependent proton leak in isolated mammalian mitochondria. // *The Journal of biological chemistry*. 2002. (277). С. 3918–3925.
51. Finley D.S., Pantuck A.J., Belldegrun A.S. Tumor biology and prognostic factors in renal cell carcinoma. // *The oncologist*. 2011. (16 Suppl 2). С. 4–13.
52. Friederich-Persson M. [и др.]. Acute knockdown of uncoupling protein-2 increases uncoupling via the adenine nucleotide transporter and decreases oxidative stress in diabetic kidneys. // *PloS one*. 2012. № 7 (7). С. e39635.
53. Furuta E. [и др.]. Metabolic genes in cancer: their roles in tumor progression and clinical implications. // *Biochimica et biophysica acta*. 2010. № 2 (1805). С. 141–52.
54. Garraway L.A., Lander E.S. Lessons from the cancer genome. // *Cell*. 2013. № 1 (153). С. 17–37.
55. Gibellini L. [и др.]. Natural Compounds Modulating Mitochondrial Functions. // *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2015. (2015). С. 527209.

56. Giorgi C. [и др.]. Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine // *Mitochondrion*. 2012. № 1 (12). С. 77–85.
57. Giorgi C. [и др.]. Mitochondrial Ca(2+) and apoptosis. // *Cell calcium*. 2012. № 1 (52). С. 36–43.
58. Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. // *The Journal of nutrition*. 2001. № 11 Suppl (131). С. 3109S–20S.
59. Guilpain P. [и др.]. The oxidation induced by antimyeloperoxidase antibodies triggers fibrosis in microscopic polyangiitis. // *The European respiratory journal*. 2011. № 6 (37). С. 1503–13.
60. Guney M., Gannon M. Pancreas cell fate // *Birth Defects Research Part C: Embryo* 2009. № type 1. С. 1–33.
61. Hajnóczky G., Hoek J. Mitochondrial longevity pathways // *SCIENCE-NEW YORK THEN* 2007. № 4 (1813). С. 634–644.
62. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. // *Cell*. 2011. № 5 (144). С. 646–74.
63. Handy D.E., Loscalzo J. Redox regulation of mitochondrial function. // *Antioxidants & redox signaling*. 2012. № 11 (16). С. 1323–67.
64. Hanschmann E.-M. [и др.]. Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin Prx3. // *The Journal of biological chemistry*. 2010. № 52 (285). С. 40699–705.
65. Hanschmann E.-M. [и др.]. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. // *Antioxidants & redox signaling*. 2013. № 13 (19). С. 1539–605.

66. Hansen J.S. [и др.]. Type 2 diabetes alters metabolic and transcriptional signatures of glucose and amino acid metabolism during exercise and recovery. // *Diabetologia*. 2015.
67. Hassanein M. [и др.]. The state of molecular biomarkers for the early detection of lung cancer. // *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*. 2012. № 8 (5). С. 992–1006.
68. Heo J., Livnat-Levanon N., Taylor E. A stress-responsive system for mitochondrial protein degradation // *Molecular cell*. 2010. № 3 (40). С. 465–480.
69. Hercule H.C., Wang M.-H., Oyekan A.O. Contribution of cytochrome P450 4A isoforms to renal functional response to inhibition of nitric oxide production in the rat. // *The Journal of physiology*. 2003. № Pt 3 (551). С. 971–9.
70. Herder C., Karakas M., Koenig W. Biomarkers for the prediction of type 2 diabetes and cardiovascular disease. // *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2011. № 1 (90). С. 52–66.
71. Hernandez-Yanez M., Heymach J. V, Zurita A.J. Circulating biomarkers in advanced renal cell carcinoma: clinical applications. // *Current oncology reports*. 2012. № 3 (14). С. 221–9.
72. Hoeks J., Wilde J. De, Hulshof M. High fat diet-induced changes in mouse muscle mitochondrial phospholipids do not impair mitochondrial respiration despite insulin resistance // *PloS one*. 2011. № 11 (6). С. 1–10.
73. Houstis N., Rosen E.D., Lander E.S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. // *Nature*. 2006. № 7086 (440). С. 944–948.
74. Hsu Y.-J. [и др.]. Effects of fenofibrate on adiponectin expression in retinas of streptozotocin-induced diabetic rats. // *Journal of diabetes research*. 2014. (2014). С. 540326.

75. Huang H. [и др.]. Key pathways and genes controlling the development and progression of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) based on gene set enrichment analysis. // International urology and nephrology. 2014. № 3 (46). С. 539–53.
76. Hur J., Sullivan K., Schuyler A. Literature-based discovery of diabetes-and ROS-related targets // BMC medical 2010. № 1 (3). С. 49.
77. Ikegami H. [и др.]. Genetic Basis of Type 1 Diabetes: Similarities and Differences between East and West. // The review of diabetic studies : RDS. 2008. № 2 (5). С. 64–72.
78. Im A.P. [и др.]. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies // Leukemia. 2014. № 9 (28). С. 1774–1783.
79. Inoguchi T. [и др.]. High Glucose Level and Free Fatty Acid Stimulate Protein Kinase C – Dependent Activation of NAD (P) H Oxidase in Cultured Vascular Cells // Diabetes. 2000. (49). С. 1939–1945.
80. Inoue K. [и др.]. Endothelial-specific CYP4A2 overexpression leads to renal injury and hypertension via increased production of 20-HETE. // American journal of physiology. Renal physiology. 2009. № 4 (297). С. F875–84.
81. Isaacs J.S. [и др.]. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. // Cancer cell. 2005. № 2 (8). С. 143–53.
82. Ishigaki Y. [и др.]. Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity. // Diabetes. 2005. (54). С. 322–332.

83. Islam A. [и др.]. The role of Hsp90 α in heat-induced apoptosis and cell damage in primary myocardial cell cultures of neonatal rats. // Genetics and molecular research : GMR. 2013. № 4 (12). С. 6080–91.
84. Jaakkola P. [и др.]. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. // Science (New York, N.Y.). 2001. № 5516 (292). С. 468–72.
85. Jiao K. [и др.]. The identification of CD163 expressing phagocytic chondrocytes in joint cartilage and its novel scavenger role in cartilage degradation. // PloS one. 2013. № 1 (8). С. e53312.
86. Johannsen D., Ravussin E. The role of mitochondria in health and disease // Current opinion in pharmacology. 2009. № 6 (9). С. 780–786.
87. Joly E. [и др.]. Glucose represses PPAR α gene expression via AMP-activated protein kinase but not via p38 mitogen-activated protein kinase in the pancreatic β -cell // Journal of Diabetes. 2009. № 4 (1). С. 263–272.
88. Junker H. [и др.]. Stage-related alterations in renal cell carcinoma--comprehensive quantitative analysis by 2D-DIGE and protein network analysis. // PloS one. 2011. № 7 (6). С. e21867.
89. Kennedy D.J. [и др.]. Plasma ceruloplasmin, a regulator of nitric oxide activity, and incident cardiovascular risk in patients with CKD. // Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN. 2014. № 3 (9). С. 462–7.
90. Kim E. [и др.]. Adenine nucleotide translocator as a regulator of mitochondrial function: implication in the pathogenesis of metabolic syndrome // Korean diabetes journal. 2010. № 3 (34). С. 146–153.
91. Kim G., Levine R.L. Molecular determinants of S-glutathionylation of carbonic anhydrase 3. // Antioxidants & redox signaling. № 7-8 (7). С. 849–54.

92. Kim Y.-J. [и др.]. Reduction in heat shock protein 90 correlates to neuronal vulnerability in the rat piriform cortex following status epilepticus // *Neuroscience*. 2013. (255). С. 265–277.
93. Koul H. [и др.]. Molecular aspects of renal cell carcinoma: a review. // *American journal of cancer research*. 2011. № 2 (1). С. 240–254.
94. Krauss S., Zhang C.-Y., Lowell B.B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. // *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2005. (6). С. 248–261.
95. LaGory E.L. [и др.]. Suppression of PGC-1 α Is Critical for Reprogramming Oxidative Metabolism in Renal Cell Carcinoma // *Cell Reports*. 2015. № 1 (12). С. 116–127.
96. Lawrence M.S. [и др.]. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. // *Nature*. 2014. № 7484 (505). С. 495–501.
97. Li Q. [и др.]. Selection of reference genes for normalization of quantitative polymerase chain reaction data in mouse models of heart failure. // *Molecular medicine reports*. 2015. № 1 (11). С. 393–9.
98. Li Y. [и др.]. UCP-2 and UCP-3 proteins are differentially regulated in pancreatic beta-cells. // *PloS one*. 2008. № 1 (3). С. e1397.
99. Li Y. [и др.]. Adipose tissue regulates hepatic cholesterol metabolism via adiponectin. // *Life sciences*. 2014. № 1 (118). С. 27–33.
100. Lin H. [и др.]. Adiponectin ameliorates iron-overload cardiomyopathy through the PPAR α -PGC-1-dependent signaling pathway. // *Molecular pharmacology*. 2013. № 2 (84). С. 275–85.
101. Linehan W.M., Ricketts C.J. The metabolic basis of kidney cancer. // *Seminars in cancer biology*. 2013. № 1 (23). С. 46–55.

102. Liu Y. [и др.]. The role of circulating microRNA-126 (miR-126): a novel biomarker for screening prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. // *International journal of molecular sciences*. 2014. № 6 (15). С. 10567–77.
103. Loria P., Lonardo A., Anania F. Liver and diabetes. A vicious circle // *Hepatology Research*. 2013. № 1 (43). С. 51–64.
104. Lowe F.J., Luetlich K., Gregg E.O. Lung cancer biomarkers for the assessment of modified risk tobacco products: an oxidative stress perspective. // *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2013. № 3 (18). С. 183–95.
105. Mailloux R.J., McBride S.L., Harper M.-E. Unearthing the secrets of mitochondrial ROS and glutathione in bioenergetics. // *Trends in biochemical sciences*. 2013. № 12 (38). С. 592–602.
106. Mansor L.S. [и др.]. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. // *Cardiovascular diabetology*. 2013. № 1 (12). С. 136.
107. Mao P., Meshul C., Thuillier P. CART peptide is a potential endogenous antioxidant and preferentially localized in mitochondria // *PloS one*. 2012. № 1 (7).
108. Marin de Mas I. [и др.]. Compartmentation of glycogen metabolism revealed from ¹³C isotopologue distributions // *BMC Systems Biology*. 2011. № 1 (5). С. 175.
109. Marselli L. [и др.]. Gene expression profiles of Beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes. // *PloS one*. 2010. № 7 (5). С. e11499.

110. Martinez-Outschoorn U.E. [и др.]. Energy transfer in «parasitic» cancer metabolism: mitochondria are the powerhouse and Achilles' heel of tumor cells. // Cell cycle (Georgetown, Tex.). 2011. № 24 (10). С. 4208–16.
111. Martins A., Nachbar R., Gorjao R. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function // Lipids Health 2012. № 1 (11). С. 30.
112. Mittal M. [и др.]. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. // Antioxidants & redox signaling. 2014. № 7 (20). С. 1126–67.
113. Möllsten A. [и др.]. The endothelial nitric oxide synthase gene and risk of diabetic nephropathy and development of cardiovascular disease in type 1 diabetes. // Molecular genetics and metabolism. 2009. № 1 (97). С. 80–4.
114. Montesanto A., Dato S., Bellizzi D. Epidemiological, genetic and epigenetic aspects of the research on healthy ageing and longevity // ... Ageing. 2012. № 1 (9). С. 6.
115. Moreno M. [и др.]. PPARs: Nuclear Receptors Controlled by, and Controlling, Nutrient Handling through Nuclear and Cytosolic Signaling. // PPAR research. 2010. (2010).
116. Muller F.L. [и др.]. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy // Free Radical Biology and Medicine. 2006. № 11 (40). С. 1993–2004.
117. Muratsu-Ikeda S. [и др.]. Downregulation of miR-205 modulates cell susceptibility to oxidative and endoplasmic reticulum stresses in renal tubular cells. // PloS one. 2012. № 7 (7). С. e41462.

118. Naito Z. [и др.]. Transient and ectopic expression of lumican by acinar cells in L-arginine-induced acute pancreatitis. // *Experimental and molecular pathology*. 2003. № 1 (74). С. 33–9.
119. Najdekr L. [и др.]. Oxidized phosphatidylcholines suggest oxidative stress in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. // *Talanta*. 2015. (139). С. 62–6.
120. Naudi A., Jove M. Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress // *Experimental diabetes research*. 2012. (2012). С. 1–14.
121. Nedergaard J., Ricquier D., Kozak L.P. Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. // *EMBO reports*. 2005. № 10 (6). С. 917–21.
122. Newsholme P. [и др.]. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. // *The Journal of physiology*. 2007. № Pt 1 (583). С. 9–24.
123. Nielsen M.J. [и др.]. The macrophage scavenger receptor CD163: endocytic properties of cytoplasmic tail variants. // *Journal of leukocyte biology*. 2006. № 4 (79). С. 837–45.
124. Odbayar T.-O. [и др.]. Isoenzyme-specific up-regulation of glutathione transferase and aldo-keto reductase mRNA expression by dietary quercetin in rat liver. // *Molecular and cellular biochemistry*. 2009. № 1-2 (325). С. 121–30.
125. Pai J.K. [и др.]. Inflammatory Markers and the Risk of Coronary Heart Disease in Men and Women // *New England Journal of Medicine*. 2004. № 25 (351). С. 2599–2610.

126. Palsgaard J. [и др.]. Gene expression in skeletal muscle biopsies from people with type 2 diabetes and relatives: differential regulation of insulin signaling pathways. // *PloS one*. 2009. № 8 (4). С. e6575.
127. Pansuria M., Xi H., Li L. Insulin resistance, metabolic stress, and atherosclerosis // *Frontiers in bioscience* (.... 2012. № 4. С. 916–931.
128. Park T. [и др.]. Statistical tests for identifying differentially expressed genes in time-course microarray experiments. // *Bioinformatics* (Oxford, England). 2003. № 6 (19). С. 694–703.
129. Patel P.H., Chaganti R.S.K., Motzer R.J. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. // *British journal of cancer*. 2006. № 5 (94). С. 614–9.
130. Persson M., Franzén S., Catrina S. Coenzyme Q10 prevents GDP-sensitive mitochondrial uncoupling, glomerular hyperfiltration and proteinuria in kidneys from db/db mice as a model of type 2 diabetes // *Diabetologia*. 2012. (55). С. 1535–1543.
131. Pescador N. [и др.]. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. // *PloS one*. 2013. № 10 (8). С. e77251.
132. Piwkowska A. [и др.]. Combined effect of insulin and high glucose concentration on albumin permeability in cultured rat podocytes. // *Biochemical and biophysical research communications*. 2015. № 2 (461). С. 383–9.
133. Qiu W. [и др.]. Genipin inhibits mitochondrial uncoupling protein 2 expression and ameliorates podocyte injury in diabetic mice. // *PloS one*. 2012. № 7 (7). С. e41391.
134. Qu H. [и др.]. Association analysis of type 2 diabetes Loci in type 1 diabetes // *Diabetes*. 2008. № July (57). С. 3–6.

135. Rafikova O., Rafikov R., Nudler E. Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002. № 9 (99). С. 5913–8.
136. Rahal A. [и др.]. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. // BioMed research international. 2014. (2014). С. 761264.
137. Rains J., Jain S. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes // Free Radical Biology and Medicine. 2011. № 5 (50). С. 567–575.
138. Rhoads D., Umbach A. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling // Plant 2006. № June (141). С. 357–366.
139. Rial E. [и др.]. Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. // The EMBO journal. 1999. № 21 (18). С. 5827–33.
140. Ricketts C.J. [и др.]. Succinate dehydrogenase kidney cancer: an aggressive example of the Warburg effect in cancer. // The Journal of urology. 2012. № 6 (188). С. 2063–71.
141. Robbins D., Zhao Y. New Aspects of Mitochondrial Uncoupling Proteins (UCPs) and Their Roles in Tumorigenesis // International Journal of Molecular Sciences. 2011. № 8 (12). С. 5285–5293.
142. Rousset S. [и др.]. UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life // FEBS Letters. 2007. (581). С. 479–482.
143. Roy P. [и др.]. Enhanced sensitivity to hydrogen peroxide-induced apoptosis in Evi1 transformed Rat1 fibroblasts due to repression of carbonic anhydrase III. // The FEBS journal. 2010. № 2 (277). С. 441–52.

144. Rudnicki M. [и др.]. Increased renal versican expression is associated with progression of chronic kidney disease. // *PloS one*. 2012. № 9 (7). С. e44891.
145. Rupperecht A. [и др.]. Role of the transmembrane potential in the membrane proton leak. // *Biophysical journal*. 2010. № 8 (98). С. 1503–11.
146. Sabarinathan R. [и др.]. Transcriptome-Wide Analysis of UTRs in Non-Small Cell Lung Cancer Reveals Cancer-Related Genes with SNV-Induced Changes on RNA Secondary Structure and miRNA Target Sites // *PLoS ONE*. 2014. № 1 (9). С. e82699.
147. Samuel V. [и др.]. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease // *Journal of Biological ...*. 2004. № 31 (279). С. 32345–53.
148. Sánchez-Aragó M. [и др.]. Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. // *Oncogenesis*. 2013. (2). С. e46.
149. Sato Y. [и др.]. Palmitate induces reactive oxygen species production and β -cell dysfunction by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase through Src signaling. // *Journal of diabetes investigation*. 2014. № 1 (5). С. 19–26.
150. Scheffler I.E. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. // *Mitochondrion*. 2001. № 1 (1). С. 3–31.
151. Sena C. [и др.]. Diabetes mellitus: new challenges and innovative therapies // *The EPMA journal*. 2010. № 1 (1). С. 138–163.
152. Shen C., Kaelin W.G. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. // *Seminars in cancer biology*. 2013. № 1 (23). С. 18–25.
153. Shuch B., Linehan W.M., Srinivasan R. Aerobic glycolysis: a novel target in kidney cancer. // *Expert review of anticancer therapy*. 2013. № 6 (13). С. 711–9.

154. Silva J.P. [и др.]. SOD2 overexpression: enhanced mitochondrial tolerance but absence of effect on UCP activity. // *The EMBO journal*. 2005. (24). С. 4061–4070.
155. Sivitz W.I., Yorek M.A. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: and Therapeutic Opportunities // *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*. 2010. № 4 (12).
156. Skulachev V. A biochemical approach to the problem of aging: “megaproject” on membrane-penetrating ions. The first results and prospects // *Biochemistry (Moscow)*. 2007. № 12 (72). С. 1385–1396.
157. Skulachev V.P. SkQ1 treatment and food restriction--two ways to retard an aging program of organisms. // *Aging*. 2011. № 11 (3). С. 1045–50.
158. Stachurska A. [и др.]. Cross-talk between microRNAs, nuclear factor E2-related factor 2, and heme oxygenase-1 in ochratoxin A-induced toxic effects in renal proximal tubular epithelial cells. // *Molecular nutrition & food research*. 2013. № 3 (57). С. 504–15.
159. Starkov A. Measurement of mitochondrial ROS production // *Protein Misfolding and Cellular Stress in Disease and* 2010. № 17 (648). С. 1–10.
160. Sudarshan S. [и др.]. Metabolism of kidney cancer: from the lab to clinical practice. // *European urology*. 2013. № 2 (63). С. 244–51.
161. Suhre K. [и др.]. Metabolic footprint of diabetes: a multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. // *PloS one*. 2010. № 11 (5). С. e13953.
162. Sun H. [и др.]. Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy. // *Molecular therapy. Nucleic acids*. 2014. (3). С. e182.
163. Sun W., Lei C., Bi C. Effect of alloxan time administerDrug on establishing diabetic rabbit model // *International journal of* 2010. № 3 (3). С. 200–2.

164. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. // *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2001. № 6 (50). С. 537–46.
165. Tabák A.G. [и др.]. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. // *Lancet*. 2012. № 9833 (379). С. 2279–90.
166. Teicher B.A., Linehan W.M., Helman L.J. Targeting cancer metabolism. // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012. № 20 (18). С. 5537–45.
167. Tong W.-H. [и др.]. The glycolytic shift in fumarate-hydratase-deficient kidney cancer lowers AMPK levels, increases anabolic propensities and lowers cellular iron levels. // *Cancer cell*. 2011. № 3 (20). С. 315–27.
168. Vasu V.T. [и др.]. Evaluation of thiol-based antioxidant therapeutics in cystic fibrosis sputum: Focus on myeloperoxidase. // *Free radical research*. 2011. № 2 (45). С. 165–76.
169. Vays V.B. [и др.]. Antioxidant SkQ1 delays sarcopenia-associated damage of mitochondrial ultrastructure. // *Aging*. 2014. № 2 (6). С. 140–8.
170. Vogelstein B. [и др.]. Cancer genome landscapes. // *Science (New York, N.Y.)*. 2013. № 6127 (339). С. 1546–58.
171. Wang A.Y.-M. [и др.]. Prognostic Value of Plasma Myeloperoxidase in ESRD Patients // *American Journal of Kidney Diseases*. 2010. № 5 (56). С. 937–946.
172. Wang F. [и др.]. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. // *Science (New York, N.Y.)*. 2013. № 6132 (340). С. 622–6.
173. Wolf G. [и др.]. Peroxiredoxin III protects pancreatic β cells from apoptosis. // *The Journal of endocrinology*. 2010. № 2 (207). С. 163–75.

174. Wolkow C., Iser W. Uncoupling protein homologs may provide a link between mitochondria, metabolism and lifespan // *Ageing research reviews*. 2006. № 2 (5). С. 1–12.
175. Xu J. [и др.]. Circulating microRNAs: novel biomarkers for cardiovascular diseases. // *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2012. № 8 (90). С. 865–75.
176. Yamanishi Y. [и др.]. Clinical features of patients with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies targeting native myeloperoxidase antigen. // *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*. 2013. № 5 (23). С. 963–71.
177. Yan H. [и др.]. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. // *The New England journal of medicine*. 2009. № 8 (360). С. 765–73.
178. Yoboue E.D., Devin A. Reactive oxygen species-mediated control of mitochondrial biogenesis. // *International journal of cell biology*. 2012. (2012). С. 403870.
179. Yoon Y., Galloway C. Mitochondrial dynamics in diabetes // *Antioxidants & redox signaling*. 2011. № 3 (14).
180. Yu Z.-W. [и др.]. Role of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 in metabolic homeostasis and insulin action: A novel opportunity for diabetes treatment? // *World journal of diabetes*. 2012. № 1 (3). С. 19–28.
181. Zee R.Y., Ridker P.M., Chasman D.I. Mitochondrial uncoupling protein gene cluster variation (UCP2–UCP3) and the risk of incident type 2 diabetes mellitus: The Women’s Genome Health Study // *Atherosclerosis*. 2011. № 1 (4). С. 107–109.
182. Zelenko Z., Gallagher E.J. Diabetes and cancer // *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2014. Т. 43. 167–185 с.

183. Zhang A.-D., Dai S.-X., Huang J.-F. Reconstruction and analysis of human kidney-specific metabolic network based on omics data. // *BioMed research international*. 2013. (2013). С. 187509.
184. Zhang B. [и др.]. Calcium-mediated signaling and calmodulin-dependent kinase regulate hepatocyte-inducible nitric oxide synthase expression. // *The Journal of surgical research*. 2015. № 2 (193). С. 795–801.
185. Zhang G.-M., Zhu Y., Ye D.-W. Metabolic syndrome and renal cell carcinoma // *World Journal of Surgical Oncology*. 2014. № 1 (12). С. 236.
186. Zhang H. [и др.]. Study on the decrease of renal d-amino acid oxidase activity in the rat after renal ischemia by chiral ligand exchange capillary electrophoresis // *Amino Acids*. 2010. № 1 (42). С. 337–345.
187. Zhang Z. [и др.]. Lesional accumulation of CD163+ macrophages/microglia in rat traumatic brain injury. // *Brain research*. 2012. (1461). С. 102–10.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ БЕЛКОВ НАИБОЛЕЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПУТЕЙ ПРИ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОЙ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ

Таблица 1 Приложения 1.

Экспрессия молекул наиболее активно изменяющихся
метаболических путей при ПКР.

Символ	Название	Fold Change	p-value
<i>TNFAIP6</i>	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	34.097	4.18E-05
<i>ANGPTL4</i>	angiopoietin-like 4	24.235	1.06E-04
<i>ANGPT2</i>	angiopoietin 2	23.692	1.49E-03
<i>CP</i>	ceruloplasmin (ferroxidase)	20.981	5.25E-05
<i>VCAN</i>	versican	20.278	2.99E-05
<i>HILPDA</i>	hypoxia inducible lipid droplet-associated	19.961	4.96E-03
<i>PXDN</i>	peroxidasin	12.789	5.23E-06
<i>NNMT</i>	nicotinamide N-methyltransferase	10.520	6.55E-05
<i>CA9</i>	carbonic anhydrase IX	10.108	7.08E-03
<i>LOX</i>	lysyl oxidase	10.033	1.97E-04
<i>FPR3</i>	formyl peptide receptor 3	7.488	1.02E-04

Таблица 1 Приложения 1 (продолжение).
 Экспрессия молекул наиболее активно изменяющихся
 метаболических путей при ПКР.

<i>EGLN3</i>	egl-9 family hypoxia-inducible factor 3	7.149	2.20E-02
<i>CYBB</i>	cytochrome b-245, beta polypeptide	7.080	6.74E-04
<i>HK2</i>	hexokinase 2	5.891	3.70E-07
<i>NDUFA4L2</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2	5.886	7.01E-03
<i>INPP5D</i>	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145kDa	5.707	9.57E-05
<i>FABP5</i>	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	5.454	1.06E-03
<i>ADCY3</i>	adenylate cyclase 3	4.567	9.66E-05
<i>TGFB1</i>	transforming growth factor, beta 1	4.541	9.74E-06
<i>NOTCH4</i>	notch 4	4.539	3.59E-02
<i>SCARB1</i>	scavenger receptor class B, member 1	4.538	4.99E-03
<i>TNFRSF1B</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	4.538	2.82E-06
<i>TGM2</i>	transglutaminase 2	4.497	6.24E-05

Таблица 1 Приложения 1 (продолжение).
 Экспрессия молекул наиболее активно изменяющихся
 метаболических путей при ПКР.

<i>GPX8</i>	glutathione peroxidase 8 (putative)	3.909	5.96E-03
<i>DGKD</i>	diacylglycerol kinase, delta 130kDa	3.876	5.24E-03
<i>PDK1</i>	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	3.859	2.32E-03
<i>ATP6VIC2</i>	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C2	-12.971	1.09E-06
<i>MTPP</i>	microsomal triglyceride transfer protein	-13.012	8.05E-08
<i>HOGA1</i>	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1	-13.203	5.10E-06
<i>ALDH6A1</i>	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	-13.335	1.05E-05
<i>CYP4A11</i>	cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11	-13.638	1.15E-02
<i>GLDC</i>	glycine dehydrogenase (decarboxylating)	-15.948	3.58E-05
<i>PCK1</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	-18.191	3.71E-03
<i>SLC4A1</i>	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1 (Diego blood group)	-18.368	9.12E-07
<i>GPD1</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	-27.763	2.39E-06

Таблица 1 Приложения 1 (продолжение).
 Экспрессия молекул наиболее активно изменяющихся
 метаболических путей при ПКР.

<i>ALDH4A1</i>	aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1	-28.342	2.87E-07
<i>G6PC</i>	glucose-6-phosphatase, catalytic subunit	-29.295	1.03E-05
<i>CYP17A1</i>	cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1	-30.721	9.80E-09
<i>DAO</i>	D-amino-acid oxidase	-42.581	4.13E-08
<i>ATP6V0A4</i>	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit a4	-42.643	9.74E-08
<i>ATP6V0D2</i>	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2	-61.694	8.55E-06
<i>NPHS2</i>	nephrosis 2, idiopathic, steroid-resistant (podocin)	-62.986	1.94E-09
<i>SLC22A6</i>	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6	-69.702	5.18E-07
<i>DIO1</i>	deiodinase, iodothyronine, type I	-71.555	6.80E-09
<i>PLG</i>	plasminogen	-73.014	1.13E-06
<i>CLDN8</i>	claudin 8	-75.284	1.44E-08
<i>TMEM52B</i>	transmembrane protein 52B	-76.950	3.12E-07

Таблица 1 Приложения 1 (продолжение).
 Экспрессия молекул наиболее активно изменяющихся
 метаболических путей при ПКР.

<i>XPNPEP2</i>	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-bound	-78.086	4.74E-08
<i>SLC34A1</i>	solute carrier family 34 (type II sodium/phosphate cotransporter), member 1	-79.441	1.48E-07
<i>SLC12A3</i>	solute carrier family 12 (sodium/chloride transporter), member 3	-90.867	1.41E-10
<i>UMOD</i>	uromodulin	-93.706	8.15E-06
<i>PAH</i>	phenylalanine hydroxylase	-117.063	5.83E-07
<i>SLC22A8</i>	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 8	-119.606	4.60E-08
<i>KNG1</i>	kininogen 1	-124.505	1.10E-08
<i>SLC36A2</i>	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 2	-125.846	5.86E-08

Таблица 1 Приложения 1 (продолжение).

Экспрессия молекул наиболее активно изменяющихся метаболических путей при ПКР

<i>HPD</i>	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	- 134.99 2	1.16E- 07
<i>CALB1</i>	calbindin 1, 28kDa	- 190.11 8	8.41E- 08