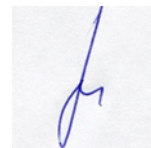


На правах рукописи



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

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Воронеж – 2016

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Научный руководитель : доктор биологических наук, профессор
Попов Василий Николаевич

Официальные оппоненты : **Москалев Алексей Александрович**
доктор биологических наук, Институт биологии
Коми НЦ УрО РАН, лаборатория молекулярной
радиобиологии и геронтологии, заведующий

Фоменко Олег Юрьевич
кандидат биологических наук, ГНУ РАСХН
«Всероссийский научно-исследовательский
ветеринарный институт патологии, фармакологии и
терапии», лаборатория патобиохимии, заведующий

Ведущая организация: НИИ Физико-химической биологии имени А. Н.
Белозерского, Московский государственный
университет

Защита состоится «12» февраля 2016 года в 13-30 часов на заседании
диссертационного совета Д 212.038.03 при ФГБОУ ВО «Воронежский государственный
университет»: 394006, Воронеж, Университетская пл. 1, аудитория 59.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке и на сайте
<http://www.science.vsu.ru> ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет».

Автореферат разослан «11» января 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук, профессор

 Грабович М.Ю.

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 18 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.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации соглашение № 14.547.21.0027 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI57414X0027).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследований

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. Индукцию экспериментальной модели диабета 1 типа осуществляли путем однократной внутрибрюшинной инъекции 5% раствора аллоксана (120 мг вещества на 1 кг массы тела животного, раствор в 0,05 М цитрате натрия). 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.

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). Тотальную РНК для полнотранскриптомного анализа генной экспрессии на платформе Affymetrix получали с помощью набора RNeasy Mini Kit («Qiagen», США). Электрофоретическое разделение препаратов РНК проводили в 1% агарозном геле.

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

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 протоколу фирмы-производителя реагентов. После циклической амплификации проводили

анализ кривых плавления продуктов реакции в диапазоне температур от 65 до 95° C. Подбор праймеров осуществляли с помощью ресурса Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Для микрочипового анализа экспрессии использовалась платформа Affymetrix® GeneAtlas™ и микрочипы GeneChip® Rat Gene и Human Gene1.1 ST (Affymetrix Inc.). Пробоподготовка и гибридизация были произведены с использованием набора Ambion® WT Expression Kit («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с протоколом производителя.

Скорость поглощения кислорода изолированными митохондриями печени крыс регистрировали амперометрически кислородным электродом типа Кларка (Hansatech Instruments, США). Измерение скорости генерации H₂O₂ осуществляли флюорометрическим способом на флюориметре Hitachi F-7000 («Hitachi», Япония).

Окислительный стресс при диабете 1 типа

С помощью платформы Affymetrix проведен полнотранскриптомный анализ генной экспрессии клеток поджелудочной железы и выявлены гены, экспрессия которых подверглась наибольшим изменениям. В наибольшей степени отрицательно регулируемые оказались гены белков-переносчиков (Nag1l – 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]. Показана отрицательная регуляция ряда генов группы Slc. Продукты этих генов - семейство митохондриальных белков-переносчиков растворимых веществ. Представители SLC, в частности SLC25, локализуются 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.

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 был выбран ряд генов-мишеней. 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 (рис. 1).

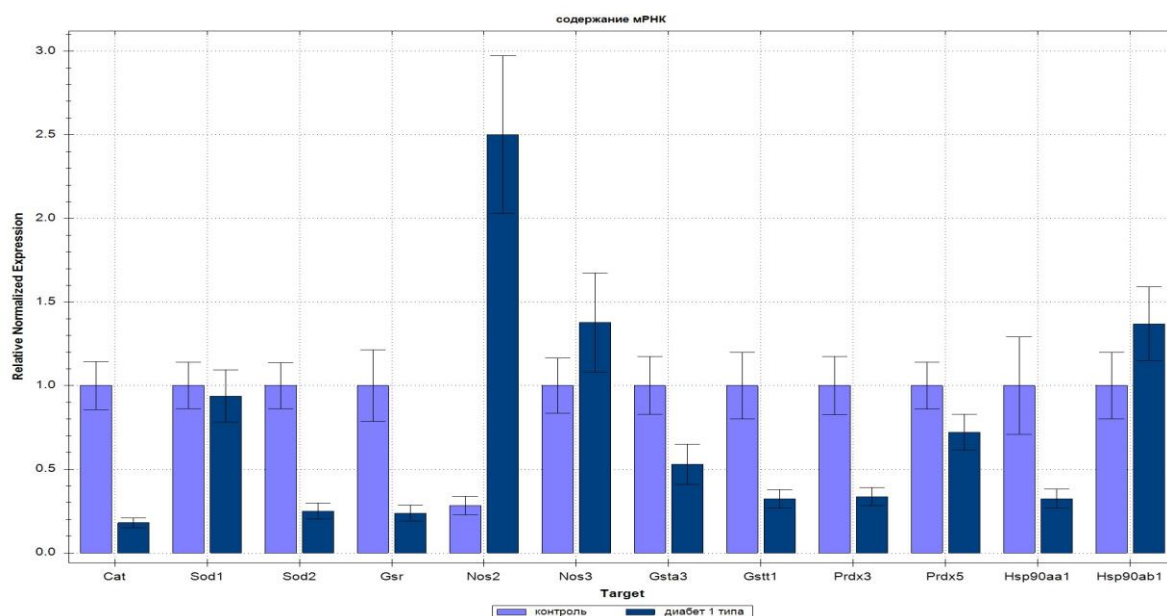


Рис. 1. Профиль генной экспрессии компонентов ферментативной системы защиты от АФК

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 сверхэкспрессия защищает β -клетки от апоптоза [173].

Нами было изучено влияние пре-терапии SkQ1 на экспрессионную регуляцию некоторых генов-мишеней окислительного метаболизма в поджелудочной железе крыс с экспериментальным диабетом (рис. 2).

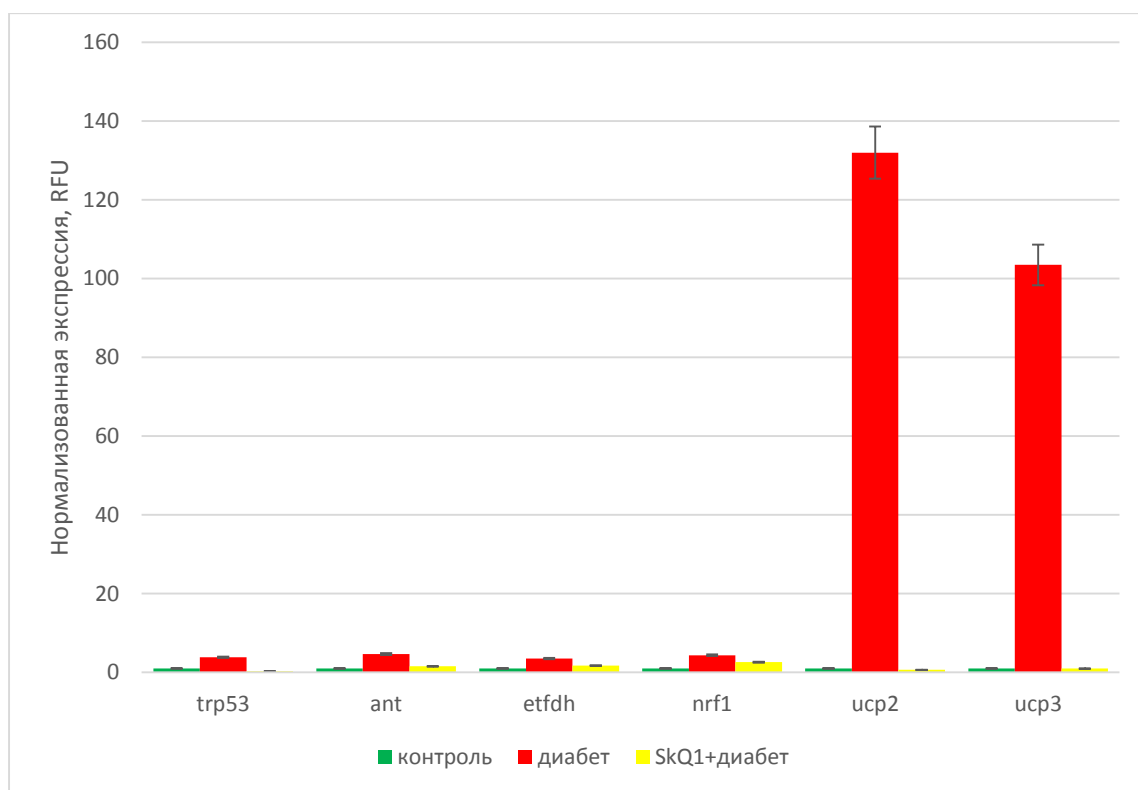


Рис. 2. Эффект антиоксиданта SkQ1 на характер экспрессии генов окислительного метаболизма.

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 обстояла 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). 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, 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*.

Эффект SkQ1 наглядно демонстрируют результаты исследования уровня глюкозы в крови животных различных экспериментальных групп (рис. 3).

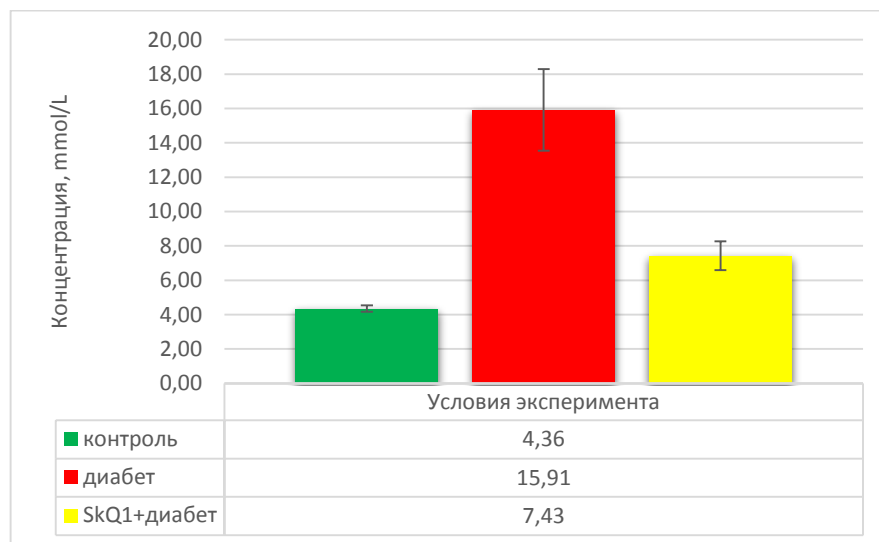


Рис. 3. Влияние SkQ1 на гипергликемию при экспериментальном диабете (n=13).

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. Подобный эффект может быть объяснен усилением антиоксидантного статуса β -клеток и противодействием токсическому влиянию аллоксана.

Были изучены респираторные характеристики изолированных митохондрий печени крыс с экспериментальным диабетом в условиях предварительной терапии SkQ1. В результате экспериментов выяснилось, что ингибирования дыхательной цепи не происходит несмотря на гипергликемию. Скорость дыхания в присутствии разбавителя, наоборот, возрастает на 57% по отношению к контролю, что, по-видимому, говорит о повышении активности пируват дегидрогеназы и цитохрома C (рис. 4).

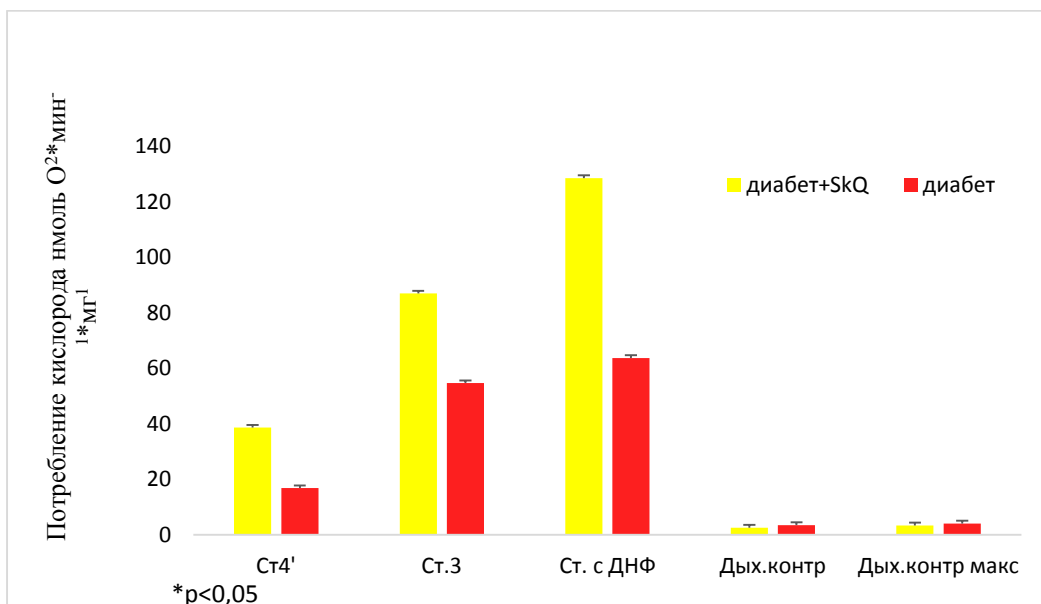


Рис. 4. Сравнение дыхательных характеристик изолированных митохондрий.

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

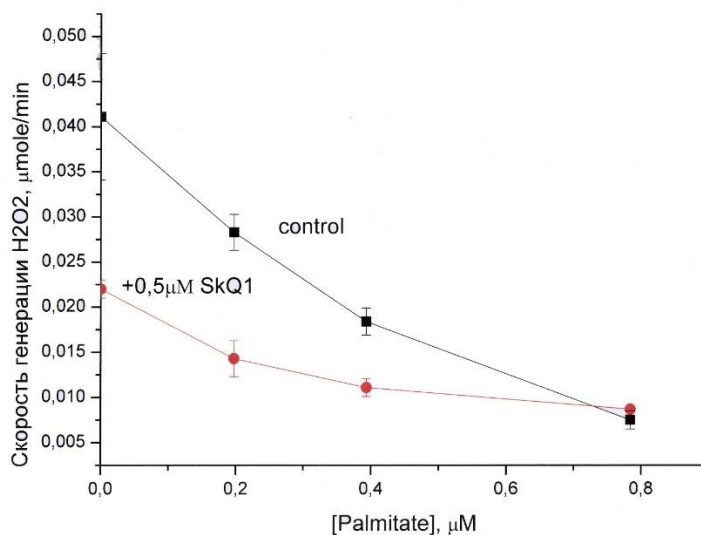


Рис. 5. Скорость генерации перекиси водорода при разобщении пальмитатом.

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 5μl 1M сукцината. 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 (рис. 6, 7). 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.

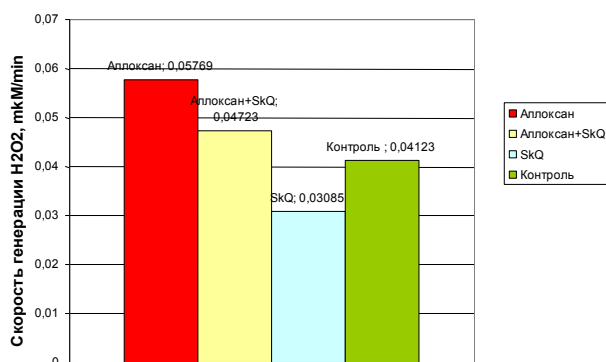


Рис. 6. Скорость генерации H₂O₂ в митохондриях почек крыс различных экспериментальных групп.

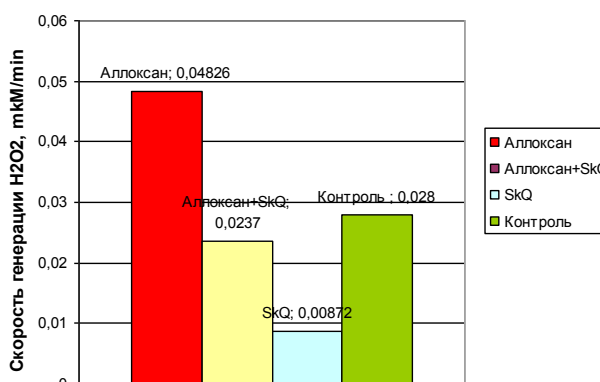


Рис. 7. Скорость генерации H₂O₂ в митохондриях печени крыс различных экспериментальных групп.

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.

Изучение светлоклеточного ПКР

В исследовании использовались ДНК-микрочипы Affymetrix® Human Gene ST 1.1 и система анализа Affymetrix® GeneAtlas®. Показано, что 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. 1 и 2.

Таблица 1.

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. Ген *ANGPTL4*, экспрессия которого повышена в почках раковых пациентов, в 24,2 раза, кодирует гликозилированный секретируемый 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. 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].

Таблица 2.

10 генов с наибольшим значением уменьшения экспрессии при светлоклеточном ПКР.

Название	ID гена (NCBI Gene)	Изменение уровня экспрессии (количество раз)	p-value
<i>CALB1</i>	793	-190,118	8,41E-08
<i>HPD</i>	3242	-134,992	1,16E-07

Таблица 2 (продолжение).

10 генов с наибольшим значением уменьшения экспрессии при светлоклеточном ПКР.

<i>SLC36A2</i>	153201	-125,846	5,86E-08
<i>KNG1</i>	3827	-124,505	1,10E-08
<i>SLC22A8</i>	9376	-119,606	4,60E-08
<i>PAH</i>	5053	-117,063	5,83E-07
<i>UMOD</i>	7369	-93,706	8,15E-06
<i>SLC12A3</i>	6559	-90,867	1,41E-10
<i>SLC34A1</i>	6569	-79,441	1,48E-07
<i>XPNPEP2</i>	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].

В таблице 3 представлено распределение мутаций по пациентам, участвующим в исследовании. Поиск мутаций осуществлялся путем сравнения данных секвенирования образцов на Ion PGM с референсным геномом. Высокая частота встречаемости мутаций в генах *VHL*, *SMARCA4*, *ROS1* соответствуют имеющимся данным исследований молекулярных механизмов почечно-клеточной карциномы. Однако высокая частота встречаемости мутаций *TP53* и *BCL2*, а также мутации в рецепторах *ERBB2* и *ERBB3* не являются характерными для описанных популяций, что позволяет сделать вывод о наличии популяционной гетерогенности заболевания на молекулярном уровне.

Таблица 3.

Частоты встречаемости мутаций.

Символ гена	Кол-во пациентов-носителей мутации	Частота встречаемости мутации, %	Полное название гена по Entrez Gene
<i>VHL</i>	23	92	Von hippel-lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase
<i>ROS1</i>	22	88	ROS proto-oncogene 1 , receptor tyrosine kinase
<i>TP53</i>	20	80	Tumor protein p53
<i>SMARCA4</i>	19	76	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4
<i>PDE4DIP</i>	18	72	Phosphodiesterase 4D interacting protein
<i>BCL2</i>	18	72	B-cell CLL/lymphoma 2
<i>SDHB</i>	16	64	Succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (ip)
<i>MTR</i>	15	60	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase
<i>PRKDC</i>	15	60	Protein kinase, dna-activated, catalytic polypeptide
<i>MLLT10</i>	14	56	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
<i>DST</i>	13	52	Dystonin
<i>GNA11</i>	13	52	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (gq class)
<i>TFE3</i>	12	48	Transcription factor binding to IGHM enhancer 3
<i>AMER1</i>	12	48	APC membrane recruitment protein 1
<i>NBPF9</i>	9	36	Neuroblastoma breakpoint family, member 15
<i>ABL2</i>	9	36	ABL proto-oncogene 2, non-receptor tyrosine kinase

Таблица 3 (продолжение).

Частоты встречаемости мутаций

<i>ERBB2</i>	7	28	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
<i>PER1</i>	5	20	Period circadian clock 1
<i>NUP98</i>	5	20	Nucleoporin 98kda
<i>TRIM33</i>	4	16	Tripartite motif containing 33
<i>PBX1</i>	2	8	Pre-b-cell leukemia homeobox 1
<i>ERBB3</i>	2	8	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 3
<i>TRIP11</i>	1	4	Thyroid hormone receptor interactor 11
<i>MNI</i>	1	4	Meningioma (disrupted in balanced translocation) 1
<i>GPR124</i>	1	4	G protein-coupled receptor 124

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. 8).

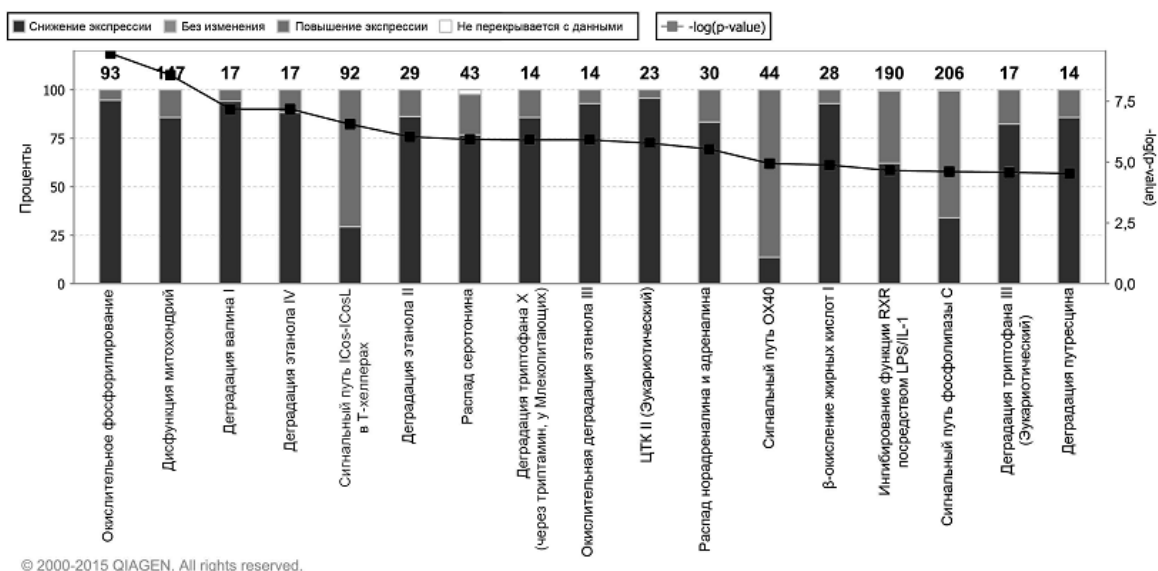


Рис. 8. Наиболее значимые метаболические пути, выявленные с помощью Ingenuity Pathway Analysis ($-\log(p\text{-value})$ которых больше 4,5).

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 3).

Таблица 4.

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

Название метаболического пути	$-\log(p\text{-value})$	Количество экспрессирующихся генов	Преобладающий тип регуляции
Окислительное фосфорилирование	9,47	93	down
Дисфункция митохондрий	8,58	147	down
Дегградация валина I	7,18	17	down
Дегградация этанола IV	7,18	17	down
Сигнальный путь ICos-ICosL	6,555	92	up
Распад серотонина	5,931	43	down

Таблица 4 (продолжение).

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

Деградация триптофана X	5,91	14	down
Цикл трикарбоновых кислот II (эукариотический)	5,778	23	down
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 I типа	2,73	92	up
Деградация супероксида	2,53	6	down

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. 9).

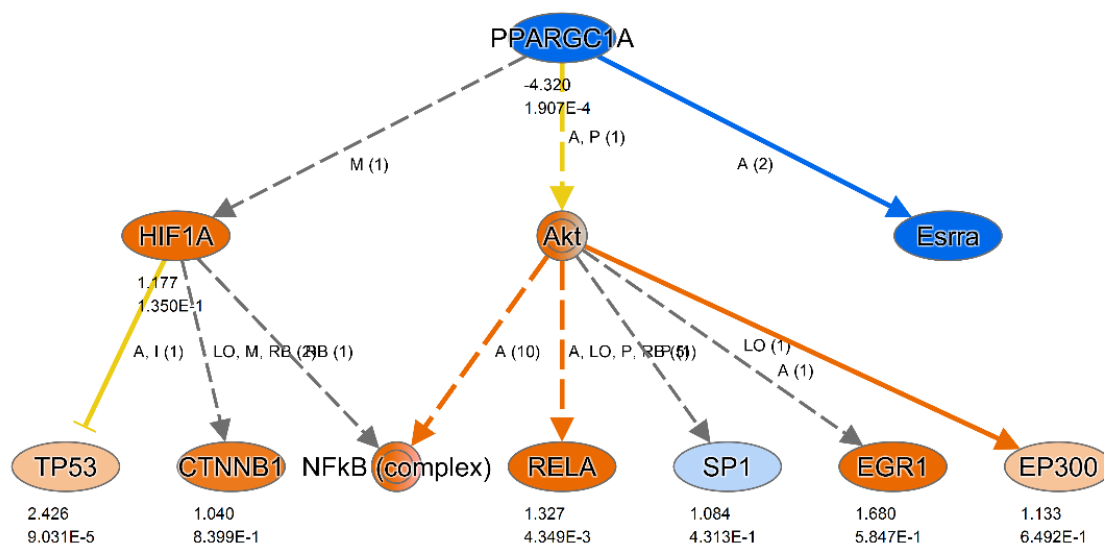


Рис. 9. Диаграмма метаболической регуляции при светлоклеточном ПКР, обусловленной активатором транскрипции PGC-1 α . Синим цветом показано предсказанное ингибирование, красным – активация; насыщенность цвета отражает степень достоверности эффекта.

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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полнотранскриптомного анализа генной экспрессии показано, что в поджелудочной железе крыс *Rattus norvegicus* с экспериментальным диабетом 1 типа в наибольшей степени отрицательно регулирурованными оказались гены белков-переносчиков, путей метаболизма углеводов аминокислот. Наибольшим уровнем экспрессии характеризовался ген *Car3*, кодирующий фермент карбоангидразу 3, в 95 раз возростала 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 (*Atp6v1g3* (-7,65)). Таким образом, наблюдается снижение антиоксидантного статуса β -клеток на фоне метаболических перестроек, затрагивающих метаболические пути углеводов, аминокислот, а также пути транспорта различных молекул.

Экспрессия почти всех генов системы защиты от АФК 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 раз, *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, возростала 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.

Изучены респираторные характеристики изолированных митохондрий печени крыс с экспериментальным диабетом в условиях предварительной терапии SkQ1. Скорость дыхания в

присутствии разобшителя 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.

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. 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. Результаты анализа активности метаболических путей, обусловленной дифференциальной экспрессией генов, выявили центральную роль митохондриального метаболизма при скПКР (рис. 10).

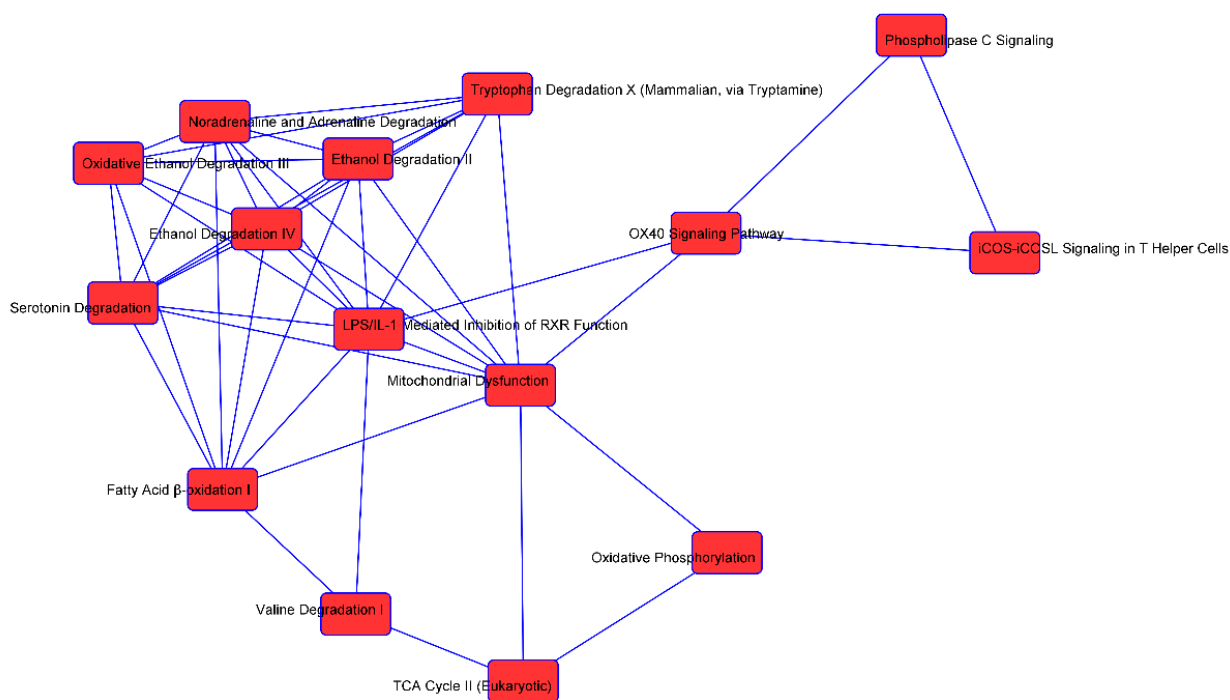


Рис. 10. Диаграмма наиболее активных метаболических путей при скПКР, построенная на основании данных дифференциальной экспрессии генов.

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.

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. 11).

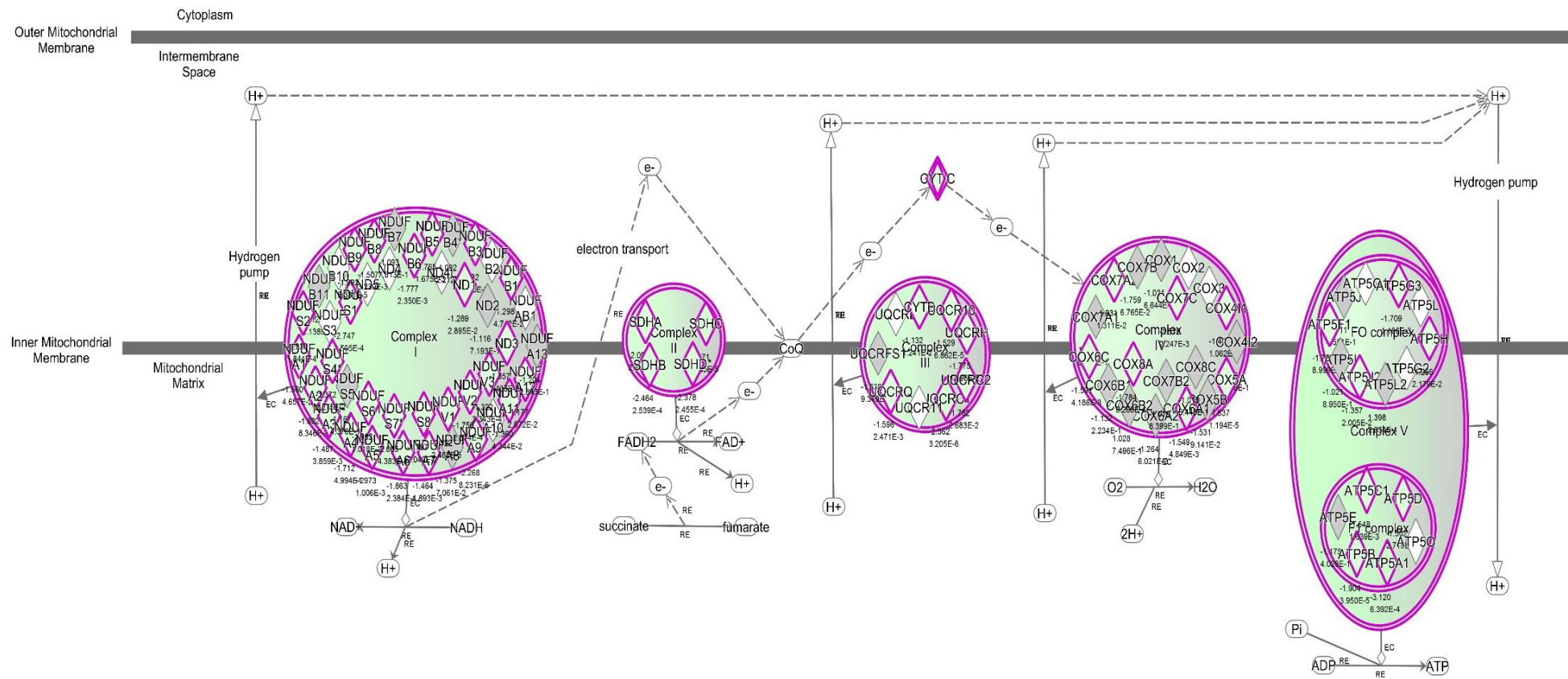


Рис. 11. Гипотетическая схема организации и регуляции процессов окислительного фосфорилирования при скПКР.

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 ПУБЛИКАЦИЙ

1. Башмаков В.Ю. Дифференциальная экспрессия изоформ изоцитратлиазы в щитках и зелёных листьях *Zea mays L.* / В.Ю. Башмаков, Е.В. Маслова, Чан Тхи Хоанг Куэн, Д.Н. Федорин, А.Т. Епринцев // Междунар. конф. «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». Сыктывкар, 2007. - ч.1. - С. 71-73.
2. Башмаков В.Ю. Исследование физико-химических свойств изоферментов изоцитратлиазы из щитков кукурузы / В.Ю. башмаков, Е.В. Маслова, Чан Тхи Хоанг Куэн, Навид М., Д.Н. Федорин // Биология наука XXI века: 11-я международная Пушкинская школа-конференция молодых учёных (Пушино, 29 октября -2 ноября 2007г.) -С. 152.
3. Башмаков В.Ю. Очистка и физико-химические свойства изоцитратлиазы из щитков кукурузы / В.Ю. Башмаков, Е.В. Маслова, Чан Тхи Хоанг Куен, Д.Н. Федорин, А.Т. Епринцев // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. Воронеж, 2007. - Вып.9. - С. 110-115.
4. Башмаков В.Ю. Субклеточная локализация активности изоцитратлиазы из щитков кукурузы / В.Ю. Башмаков, Е.В. Маслова, Д.Н. Федорин, В.Н. Попов, А.Т. Епринцев // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2007. №2. – С. 71-74. **(Перечень ВАК)**
5. Башмаков В.Ю. Динамика активности ферментов основных метаболических путей в печени крыс с аллоксановым диабетом / В.Ю. Башмаков, Сатар Ф. Абуд, В. Н. Попов, А. Т. Епринцев // Физиология и психофизиология мотиваций: межрегион. сб. науч. работ, посвящ. 90-лет. ВГУ и биол.-почв. фак. — Воронеж, 2008. — Вып. 9. - С. 30-31.
6. Башмаков В.Ю. Идентификация гена МДГ в печени крыс с аллоксановым диабетом / В.Ю. Башмаков, Сатар Ф. Абуд, А.Т. Епринцев, В. Н. Попов // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегион. сб науч. работ. — Воронеж, 2008. — Вып. 10. - С. 41-45.
7. Башмаков В.Ю. Изменение активности генов, кодирующих разобщающие белки митохондрий, в печени крыс при аллоксановом диабете / В.Ю. Башмаков, А.Т. Епринцев, В.Н. Попов // Материалы III Всероссийской конференции молодых ученых-медиков, организованной ВГМА им. Н.Н. Бурденко и КГМУ. – Воронеж, 2009. – Т.2. – С. 213.
8. Башмаков В.Ю. Митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 снижает экспрессию генов разобщающих белков UCP2 и UCP3 в поджелудочной железе крыс с аллоксановым диабетом / В.Ю. Башмаков, Д.А. Кретов, Н.А. Карпеченко, В.Н. Попов, А.Т. Епринцев // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегион. сб. науч. работ. – Воронеж, 2010. – Вып. 12. – С. 47-50.
9. Башмаков В.Ю. Регуляция аконитазной активности в гепатоцитах крыс в условиях экспериментального аллоксанового диабета / В.Ю. Башмаков, А. Альнасер, Н.А. Карпеченко, Х. Аль Дайни Саба // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине: сб. тр. 1-й междунар. науч.-практ. конф, 23-26.11.2010, СПб. — СПб. 2010.— Т. 1. – С.99-100.
10. Башмаков В.Ю. Изменение активности некоторых ферментов цикла Кребса в различных органах крыс с аллоксановым диабетом / В.Ю. Башмаков, Аль Дайни Саба Х., М.Ю. Сыромятников, А.Т. Епринцев // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегион. сб. науч. работ. Вып. 13. — Воронеж, 2011. — С. 134-137.
11. Башмаков В.Ю. Роль системы врожденного иммунитета, генетических факторов и антиоксидантных ферментов в патогенезе послеродового эндометрита / В.Ю. Башмаков, О.П. Лебедева, Н.И. Самборская, С.П. Пахомов, В.Н. Попов, М.И.Чурносков,

- П.В. Калуцкий, О.Н. Ивашова, П.Г. Довгий, П.А. Карпов // Научные ведомости Белгородского государственного университета. - Серия Медицина. Фармация. 2011. № 16 (111). Выпуск 15. – С. 95-99. **(Перечень ВАК)**
12. Башмаков В.Ю. Влияние безафибрата на интенсивность дыхания мышей линии c57bl6/j / В.Ю. Башмаков, Дорохова В.В., Корнеева М.М., Паневина А.В., Солодских С.А., Шматкова М.Л., Старков А.А., Попов В.Н. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегион. сб. науч. работ. Вып. 14. — Воронеж, 2012. – с. 34-38.
 13. Башмаков В.Ю. Оптимизация изоляции ДНК из тканей печени крысы и использованием техники, основанной на сорбции нуклеиновых кислот / В.Ю. Башмаков, С.А. Солодских, А.В. Паневина, Шматкова, В.Н. Попов // Сорбционные и хроматографические процессы. Воронеж, 2012. — Т. 12, вып. 5. - С. 764-769. **(Перечень ВАК)**
 14. Башмаков В.Ю. Исследование гуанидинизотиоционата для быстрого выделения РНК для изучения молекулярной биоэнергетики клетки с использованием полимеразной цепной реакции / В.Ю. Башмаков, М.Н. Агафонова, А.А. Попова, В.Н. Попов, Е.В. Костромичева, И.В. Кубланов, О.А. Подосокорская, О.П. Лебедева, Н.А. Рудых, С.С. Сиротина, К.Г. Лямзаев, М.А. Симонова, М.Н. Тутукина // Сорбционные и хроматографические процессы. — Воронеж, 2012. — Т. 12, вып. 6. - С. 1005-1010. **(Перечень ВАК)**
 15. Башмаков В.Ю. Mitochondrial Energy-Dissipating Systems (Alternative Oxidase, Uncoupling Proteins, and External NADH Dehydrogenase) Are Involved in Development of Frost-Resistance of Winter Wheat Seedlings / Bashmakov V. Yu., Gabelnych O. I., Borovik O. A., Tauson E. L., Pobezhimova T. P., Katyshev A. I., Pavlovskaya N. S., Koroleva N. A., Lyubushkina I. V., Popov V. N., Borovskii G. B., and Voinikov V. K. // Biochemistry. - Moscow, 2014. Vol. 79, №6. – pp. 506-519 **(Перечень ВАК)**
 16. Башмаков В.Ю. Определение профиля экспрессии клеток линии Hela с использованием ДНК-микрочипов / В.Ю. Башмаков, С.А. Солодских, Паневина, М.Л. Шматкова, А.А. Старков, В.Н. Попов // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. — Воронеж, 2013. — Вып. 15. - С. 194-198.
 17. Башмаков В.Ю. Вклад транспортера адениновых нуклеотидов в разобщение окислительного фосфорилирования в условиях экспериментального диабета 1 типа / В.Ю. Башмаков, А.В. Паневина, И. Симанич, В.Н. Попов // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. — Воронеж, 2014. — Вып. 16. - С. 19-23.
 18. Башмаков В.Ю. Полногеномный анализ экспрессии генов при светлоклеточном почечно-клеточном раке с использованием ДНК-микрочипов высокой плотности Affymetrix / В.Ю. Башмаков, С.А. Солодских, А.В. Паневина, Т.М. Горбачева, И.П. Мошуров, А.А. Михайлов, А.Ю. Маслов, В.Н. Попов // Организационные и лечебно-диагностические технологии в противораковой борьбе: 90 лет Воронежской онкологической службе. — Воронеж, 2014. — С. 99-101.