

Таблица

Содержание TREC в лимфоцитах крови здоровых доноров и больных РА

Возраст, годы	Здоровые доноры		Больные РА	
	Число обследованных лиц, n	ТРЭК, копий на 1 тыс. лимфоцитов	Число обследованных лиц, n	ТРЭК, копий на 1 тыс. лимфоцитов
41-50	23	2,61 (1,11-4,61)	14	1,10 (0,67-2,44)
51-60	7	1,79 (1,48-4,18)	17	0,44* (0,24-1,13)
61-70	5	1,45 (1,24-1,88)	9	0,03* (0,00-0,63)

* - $P < 0,05$ в сравнении с контрольной группой

Представленные в таблице данные свидетельствуют о том, что уровень TREC в пересчете на 1 тыс. лимфоцитов крови снижается с возрастом как у здоровых лиц, так и у больных ревматоидным артритом. Однако степень снижения ТРЭК-содержащих лимфоцитов у больных РА существенно выше. Так, это снижение у здоровых лиц с 40 до 70 лет происходит лишь в 1,8 раза, в то время как уровень клеток, содержащих ТРЭК, при РА снижается более, чем в 35 раз (почти до нуля), т.е. можно констатировать ускоренное старение тимуса при РА.

Сравнение уровня ТРЭК у больных РА с показателями их уровня у здоровых лиц показало значительное снижение содержания TREC при ревматоидном артрите, причем выраженность различий по содержанию TREC увеличивается с возрастом: она 2-кратная для возраста 41-50 лет, 4-кратная

для возраста 51-60 лет и 48-кратная для лиц старше 60 лет. Различия статистически значимы в возрастных группах старше 50 лет ($P < 0,01$).

Заключение. Снижение содержания TREC при РА можно трактовать как свидетельство ослабления Т-лимфопоэтической функции тимуса при ревматоидном артрите. Однако вклад в снижение уровня TREC в периферических Т-клетках может вносить усиление пролиферации Т-клеток. При ревматоидном артрите это может быть связано с реакцией аутоспецифических клонов на антигены организма. Приведенные в нашей работе результаты требуют проведения более прицельных исследований в области аутоиммунной патологии в контексте исследования пролиферации Т-клеток на периферии.

ПИЛОТНАЯ ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ ИНТЕРАКТОМНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ КАСКАДА NFE2L2/AP1 ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ДИАГНОСТИКИ

Золотухин П.В., Лебедева Ю.А., Кузьмина О.Н., Беланова А.А., Чмыхало В.К., Коринфская С.А., Александрова А.А.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Окислительный статус, понимаемый как система взаимоотношений между про- и антиоксидантными компонентами клетки, является «точкой» пересечения ключевых метаболических систем. Дисфункции систем, формирующих окислительный статус, ассоциированы с широким спектром патологий (Papp et al., 2012). Реактивные системы окислительного статуса потенциально могут быть использованы для разработки диагностических и терапевтических средств, основанных на профилировании состояния клеточных каскадов и позволяющих оценивать «входящие сигналы» и эффективность работы регуляторных конкурсов клетки. Одной из наиболее изученных реактивных систем окислительного статуса является композитный контур NFE2L2/AP1.

Цель и задачи

Целью настоящего исследования стала первичная проверка концепции анализа экспрессии генов для целей дифференциальной диагностики гетерогенных состояний и синдромов с помощью профилирования состояния интерактомного каскада окислительного статуса NFE2L2/AP1. Задачами исследования стали:

1. Выбор наиболее изученных с точки зрения контроля индуцибельной экспрессии маркеров-компонент интерактома окислительного статуса;
2. Разработать процедуру интерактомно-экспрессионного анализа;
3. Проанализировать экспрессию выбранных марке-

ров в разных условиях модельного слабого стрессорного воздействия;

4. Разработать метод анализа функционирования интерактомных каскадов на основе данных экспрессионного анализа.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 8 условно здоровых студентов факультета биологических наук Южного федерального университета в возрасте от 19 до 21 года. Исследования были проведены в соответствии с нормами биоэтики. Для исследования использовалась цельная венозная кровь. Забор крови для выделения РНК, последующих ОТ, ПЦР и электрофоретического полуколичественного анализа проводился 4 раза в течение двух месяцев у одних и тех же испытуемых (дизайн повторных измерений). Первый и второй заборы проводились через промежуток в 24 часа в период экзаменационной сессии. Третий забор проводился спустя 6 недель после первого забора, четвертый забор - через 3 недели после третьего (семестровый период). Два периода исследования представляют собой классическую модель умеренного каждодневного психосоциального стресса (Карякина, 2010; Trueba et al., 2013). Анализируемые факторы были представлены подчиненными транскрипционных факторов NFE2L2 и AP1, обнаруживающих сходные трансактивационные свойства, и включали: *KEAP1*, *BACH1*, *FOSL1*, *SRXN1*, *NQO1*, *HMOX1*, *TXN* и *PRDX6*. Референтным геном был

выбран TBP. Статистический анализ проводили с использованием Medcalc 11.4 (MedCalc, Software, Бельгия) и Statistica 7 (StatSoft, США). Статистическая значимость оценивалась с использованием непараметрических критериев: критерий Фридмана, критерий Манна-Уитни, критерий Уилкоксона. Диагностические характеристики оценивались методом ROC-анализа по DeLong et al., 1988. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Основные результаты

Отсутствие изменений в уровнях транскрипции регулятора *NFE2L2*, как между стадиями исследования, так и в пределах сходных стрессогенных условий позволило в рамках настоящего исследования разработать подход для оценки удельной экспрессии анализируемых факторов – путем расчета соотношения экспрессий подчиненного и регулятора. Отсутствие значимой динамики экспрессии *NFE2L2* свидетельствовало в пользу того, что уровень экспрессии регулятора можно считать стабильным за промежуток времени, необходимый для изменения экспрессии его подчиненных. Вторым необходимым условием расчета удельной экспрессии является минимальное количество регуляторных уровней при трансляции белка регулятора. Согласно литературным данным *NFE2L2* имеет очень короткий период протеолиза как в базальных, так и в стрессорных условиях, и постоянная трансляция *NFE2L2* необходима для реализации ответа каскада.

В результате анализа динамики экспрессии выбранных генов-маркеров в течение суток в период сессии, было выявлено, что в условиях предэкзамениционного стресса наблюдается повышение удельного уровня экспрессии *NQO1*, *HMOX1*, *TXN* и снижение удельной экспрессии *SRXN1*. Полученные результаты свидетельствовали о том, что в условиях предэкзамениционного стресса, по-видимому, происходит активация сигнального каскада *NFE2L2* и активация цитопротекторных механизмов. Анализируемые в данном исследовании факторы имеют несколько транскрипционных регуляторов, однако единственным общим для них механизмом обеспечения индуцибельной экспрессии является подчиненность сигнальным каскадам, зависимым от ARE- и TRE-последовательностей. А значит, в условиях стрессорных воздействий ожидается сходный характер индукции их

экспрессии. В результате анализа корреляционной матрицы было установлено, что большая часть генов демонстрирует сходные тенденции экспрессии в условиях стресса. В условиях низкого уровня стресса взаимосвязи уровней экспрессии факторов, полученные на основании корреляционного анализа, практически исчезают.

В результате статистического анализа данных, характеризующих экспрессию изучаемых маркеров в периоды сессии и семестра, было установлено, что в условиях более интенсивного стресса наблюдается повышение индивидуальной удельной экспрессии, а также, более выражено, удельной экспрессии *NQO1*, *HMOX1*, *BACH1*, *KEAP1*, *FOSL1*, *SRXN1*. Полученные данные свидетельствовали о том, что данная картина изменений экспрессии при изменении стрессорных условий связана с активацией композитного сигнального каскада *NFE2L2/AP1*. Таким образом, система факторов, подчиненных каскадам *NFE2L2* и *AP1*, оказалась достаточно чувствительной для регистрации изменений уровня мягкого стрессора – психоэмоционального стресса.

ROC-анализ показал, что совокупное применение компонент каскада *NFE2L2* (*BACH1* tv2, *SRXN1*, *NQO1*, *HMOX1*, *KEAP1*), позволяет добиться чрезвычайно высоких диагностических характеристик интерактивного тестирования – до 100% (без учета доверительного интервала) совокупных чувствительности и специфичности для дифференциации даже различных психоэмоциональных состояний. Площадь под каждой ROC-кривой при этом при парном сопоставлении состояний в настоящем исследовании составляла от 87% до 96%.

Заключение и выводы

Даже в умеренных психологических стрессорных условиях наблюдается активация сигнально-экспрессионного (интерактивного) каскада реактивной антиоксидантной защиты *NFE2L2/AP1*. В связи с наличием большого количества ассоциаций системы окислительного статуса с патологиями человека, разработанный нами подход может быть применен для создания диагностических систем, направленных на выявление широкого спектра нарушений в жизнедеятельности клетки.

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ «ЛИГАНД-РЕЦЕПТОР» ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ АЛЬФА КАК МАРКЕР РАЗВИТИЯ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА

Прохоренко Т.С., Саприна Т.В., Зима А.П., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В.

ГБОУ ВПО Сибирский Государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

Введение. Клинические наблюдения показывают, что у пациентов с болезнью Грейвса при одинаковом диагнозе могут быть в разной степени выражены тяжесть проявлений заболевания, формирование стойкой медикаментозной и спонтанной ремиссии, темпы формирования узловых образований и их объем. Существующие на сегодняшний день диагностические маркеры и алгоритмы, основанные на исследовании показателей сыворотки крови, не всегда дают возможность врачу прогнозировать особенности развития заболевания и исход аутоиммунного процесса, а, следовательно, применять оптимальную для больного схему лечения. Идентификация новых маркеров, ассоциированных с клиническими особенностями заболевания, необходима для оптимизации существующих диагностических и тера-

певтических технологий консервативного направления. Кандидатами таких маркеров являются молекулы-регуляторы аутоиммунного воспаления щитовидной железы – цитокины, в частности, фактор некроза опухолей альфа (TNF α).

Цель: охарактеризовать систему «лиганд-рецептор» фактора некроза опухолей альфа (цитокин, мембраносвязанная и растворимая формы рецепторов) у пациентов с болезнью Грейвса.

Задачи: 1. Дать оценку продукции TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови и состояния рецепторного аппарата лимфоцитов крови (количества клеток, несущих рецептор к TNF α и концентрация растворимой формы рецептора) у пациентов с болезнью Грейвса.

2. Определить характер экспрессии рецептора к TNF α