

Старикова Елена Григорьевна

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА БЕЛКИ-
РЕГУЛЯТОРЫ АПОПТОЗА**

14.00.16 – патологическая физиология
03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
профессор

Рязанцева Наталья
Владимировна

доктор медицинских наук,
профессор, академик РАМН,
Заслуженный деятель науки РФ

Новицкий Вячеслав Викторович

Официальные оппоненты:

доктор медицинский наук,
профессор
доктор медицинских наук

Агафонов Владимир Иванович
Потапов Алексей Валерьевич

Ведущая организация: ГУ научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН (г. Новосибирск)

Защита состоится «__» _____ 2008 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава (634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава

Автореферат разослан «__» _____ 2008г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Нарушения реализации программированной гибели клеток являются важным патогенетическим фактором развития социально значимых заболеваний человека (злокачественные новообразования, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, острые и хронические воспалительные процессы, сахарный диабет и др.), что обуславливает интенсивность исследований, посвященных установлению молекулярных механизмов ее дисрегуляции. В норме апоптотическая гибель необходима для поддержания тканевого гомеостаза за счет устранения избыточных и/или функционально неполноценных клеток. Реализация суицидальной программы зависит от баланса про- и антиапоптотических систем в клетке и регулируется комплексом генетических, молекулярных и биохимических факторов, большинство из которых полностью не верифицировано [Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В., 2002; Фильченков А.А., 2003; Рязанцева Н.В. и соавт., 2006].

В последние годы особое внимание уделяется роли окислительного стресса в развитии апоптоза. Универсальность явления программированной гибели позволяет предположить участие активных форм кислорода (АФК) в регуляции другого типового механизма регуляции клеточного гомеостаза - апоптоза [Cai H., Harrison D.G., 2000; Зенков Н.К. и соавт., 2001; Ляхович В.В. и соавт., 2005].

АФК обладают высокой реакционной способностью, позволяющей им взаимодействовать с липидами, белками, нуклеиновыми кислотами и углеводами. В высоких концентрациях АФК индуцируют процессы перекисного окисления липидов в биологических мембранах, повреждение мембраносвязанных белков и ДНК клетки, инактивацию ферментов [Alder V. et al., 1999; Дубинина Е.Е., 2001; Zhu H. et al., 2001]. Однако в настоящее время концепция, предполагающая исключительно повреждающее влияние АФК на функционирование клетки, пересматривается. Широкую известность приобрел термин «окислительная регуляция», отражающий активную роль окислительно-восстановительной модификации протеинов в регуляции функции клетки [Kim B.Y. et al., 2001; Haddad J., 2002]. Измененные в результате воздействия АФК молекулы являются «сигналами», несущими биологическую информацию, необходимую для регуляции различных клеточных функций, в частности, апоптоза [Sorescu D., 2001; Safa O., 2001; Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В., 2007].

АФК влияют на различные пути инициации апоптотической программы (митохондриальный, рецепторный, ядерный) непосредственно или через внутриклеточные редокс-зависимые сигнал-передающие системы [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006]. При воздействии стрессового стимула в клетке может происходить одновременная активация нескольких молекулярных путей, взаимодействующих между собой [Wajant H., 2002; Schultz D.R. Harrington W.G., 2003]. Интеграция

различных вариантов запуска апоптоза может происходить на уровне транскрипционных факторов. Одним из редокс-чувствительных транскрипционных факторов является NF- κ B [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006]. Данный фактор транскрипции вовлечен в регуляцию воспалительного ответа (синтез IL-2, -8), опухолевую прогрессию, в частности, за счет влияния на реализацию апоптотической программы [Stark L.A., Dunlop M.G., 2005; Perkins N.D., Gilmore T.D., 2006]. К транскрипционным мишеням NF- κ B относят гены, кодирующие белки Bcl-XL, IAP, A1, ответственные за угнетение процесса апоптоза [Kucharczak J. et al., 2003].

АФК могут изменять соотношение между про- и антиапоптотическими протеинами семейства Bcl-2, являющимися ключевыми регуляторами программированной гибели клеток. Известно, что синтез ряда белков данного семейства находится под контролем редокс-чувствительных транскрипционных факторов, в частности, p53 активирует экспрессию Bid, Puma и Noxa; NF- κ B - Bcl-XL [Oda E. et al., 2001; Sax J.K. et al., 2002; Kucharczak J. et al., 2003].

Таким образом, АФК, являясь вторичными мессенджерами, могут изменять функционирование клетки вплоть до запуска в ней суицидальной программы. Учитывая ключевую роль дисрегуляции апоптоза в патогенезе ряда распространенных заболеваний человека, изучение роли окислительного стресса в механизмах изменения реализации программированной гибели клеток позволит создать новые патогенетически-обоснованные технологии терапии социально значимых заболеваний.

Цель исследования: установить молекулярные механизмы модификации редокс-чувствительных белков-регуляторов апоптоза при окислительном стрессе.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи исследования:**

1. Определить содержание проапоптотических (Bax, Bad) и антиапоптотических (Bcl-2, Bcl-X_L) белков-регуляторов апоптоза в мононуклеарных лейкоцитах при окислительном стрессе *in vitro*.

2. Установить роль факторов транскрипции (NF- κ B, p53) в нарушении регулирующего влияния про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в мононуклеарных лейкоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro*.

3. Оценить влияние дисбаланса окислительного метаболизма на экспрессию м-РНК белков-регуляторов апоптоза в мононуклеарных лейкоцитах крови.

4. Установить молекулярные механизмы дисрегуляции программированной гибели мононуклеарных лейкоцитов крови, реализуемые на уровне транскрипционных факторов, при остром воспалительном процессе.

Научная новизна. Впервые установлено, что активация редокс-чувствительных факторов транскрипции NF- κ B и p53 вовлечена в дизрегуляцию апоптоза при окислительном стрессе. Получены приоритетные данные о дисбалансе содержания про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в условиях повышенной продукции АФК. Показано, что нарушение системы про- и антисуицидальных протеинов семейства Bcl-2 опосредовано влиянием факторов транскрипции NF- κ B и p53 на экспрессию соответствующих генов-мишеней. Установлены однотипные механизмы дигрегуляции программированной гибели мононуклеарных лейкоцитов крови при экспериментальном окислительном стрессе, индуцированном 1 мМ перекисью водорода и острым воспалением.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в результате проведенного исследования фактические данные описывают молекулярные механизмы дизрегуляции программированной гибели мононуклеарных лейкоцитов при экспериментальном окислительном стрессе и при острым воспалении. Установлена роль факторов транскрипции p53 и NF- κ B в регуляции экспрессии генов белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2. Основные положения исследования могут служить основой для дальнейшего изучения редокс-чувствительных механизмов регуляции клеточных функций, поиска молекулярных мишеней, подверженных воздействию активных форм кислорода. Результаты проведенного исследования позволят разработать новые технологии коррекции нарушений программы клеточной гибели при заболеваниях, сопровождающихся дисбалансом окислительного метаболизма.

Положения, выносимые на защиту:

1. При окислительном стрессе в клетках имеет место дисбаланс белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2: повышение содержания проапоптотического белка Bax, отсутствие изменения содержания антисуицидальных белков Bcl-2 и Bcl-X_L.

2. Воздействие активных форм кислорода на редокс-чувствительные элементы сигнал-передающих путей приводит к изменению экспрессии генов, кодирующих белки-регуляторы апоптоза семейства Bcl-2.

3. Активация факторов транскрипции p53 и NF- κ B при окислительном стрессе *in vitro* приводит к изменению профиля экспрессии генов, находящихся под контролем данных транскрипционных факторов.

4. Дисбаланс окислительного метаболизма при острых воспалительных заболеваниях сопровождается дизрегуляцией апоптоза за счет активации редокс-чувствительных факторов транскрипции, влияющих на экспрессию генов белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2.

Апробация и внедрение результатов работы. Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на VIII Международном конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2007), III Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2007), Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2007), Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины» (Абакан, 2007).

Основные результаты диссертационного исследования включены в лекционный курс по патологической физиологии (разделы «Общая патофизиология клетки» и «Патофизиология иммунной системы») для студентов лечебного и педиатрического факультета ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава.

Исследования поддержаны Советом по грантам при Президенте РФ для поддержки ведущих научных школ РФ в рамках проекта «Молекулярные основы нарушения гомеостаза клеток при актуальных заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы» (НШ-4153.2006.7), РФФИ - «Молекулярные механизмы управления программированной гибелью клеток с использованием регуляторных молекул» (№ 07-04-12150), а также выполнены в рамках ФЦНТП (проект «Разработка способов коррекции нарушений регуляции апоптоза клеток при патологических процессах в условиях окислительного стресса», государственный контракт № 02.442.11.7276 от 20.02.2006 г).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ, из них 1 – в центральном рецензируемом журнале, рекомендованном ВАК.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследования), выводов и списка литературы, включающего 252 источника, из них - 55 отечественных и 197 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 5 таблицами и 31 рисунком.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО И КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для реализации предпринятого нами исследования были выделены экспериментальный и клинический блоки, включавшие манипулирование *in vitro* мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров и больных острыми воспалительными заболеваниями.

В исследование были включены 46 здоровых доноров в возрасте от 18 до 50 лет (мужчины - 20, женщины - 26). Обследовали 49 больных (25

мужчин и 24 женщины в возрасте от 18 до 50 лет, средний возраст – 32 ± 3 лет) с острыми воспалительными заболеваниями (внебольничная пневмония, острый аппендицит). Пациенты были обследованы при госпитализации в терапевтическое и хирургическое отделения ММЛПУ Городская больница №1 (главный врач - С.М. Кирютенко), и госпитальные клиники ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (главный врач – Заслуженный врач РФ, к.м.н. В.М. Шевелев), клиники Военно-медицинского госпиталя (зав. кафедрой терапии и усовершенствования врачей – к.м.н., доц. Т.С. Агеева).

Критериями исключения являлись возраст моложе 18 и старше 50 лет; период обострения хронических воспалительных заболеваний; аутоиммунные, наследственные и психические болезни, алкогольная и наркотическая зависимости.

Материалом для исследования служила кровь, стабилизированная гепарином (25 Ед/мл).

Исследование проводилось на базе Межкафедральной научно-образовательной лаборатории молекулярной медицины ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (зав. лабораторией – д.м.н. Л.С. Литвинова), лаборатории фармакогеномики НИИ химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск) (зав. лабораторией – к.б.н. М.Л. Филипенко).

В соответствии с поставленной целью и задачами исследования нами был предложен дизайн, предполагающий разделение работы на два последовательных этапа. На первом этапе исследования проводили оценку выраженности апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови в условиях экспериментального окислительного стресса и в клинике острого воспаления, состояния ключевых путей инициации программированной гибели клеток (рецепторный, митохондриальный-опосредованный, ядерный). На втором этапе исследования для проверки гипотезы участия редокс-чувствительных элементов в дизрегуляции апоптоза проводили оценку активности транскрипционных факторов p53 и NF- κ B. Для этого определяли наличие в цитоплазме клеток белковых продуктов активации данных транскрипционных факторов, в дальнейшем – оценивали их влияние на экспрессию генов белков-регуляторов апоптоза (Bcl-2, Bcl-XL, Bax и Bad), находящихся под транскрипционным контролем указанных молекул. Для определения участия протеинов семейства Bcl-2 в дизрегуляции апоптоза измеряли содержание про- (Bax, Bad) и антиапоптотических (Bcl-2, Bcl-XL) представителей данного семейства в клетках (табл. 1).

Мононуклеарные лейкоциты выделяли из крови путем центрифугирования на слое фиколла (“Pharmacia” Швеция) плотностью 1,077. Выделенные мононуклеарные лейкоциты инкубировали в течение 18 ч при температуре 37°C в полной питательной среде. Для индукции окислительного стресса в клеточные культуры добавляли перекись

водорода в различных концентрациях (10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ и 1 мМ).

Таблица 1

Распределение здоровых доноров и пациентов с острыми воспалительными заболеваниями, в соответствии с проведенными методами исследования

Методы исследования	Группы обследованных		
	Здоровые доноры	Экспериментальный блок исследования (культивированные клетки <i>in vitro</i> с 10, 50, 100, 500 мкМ и 1мМ H ₂ O ₂)	Клинический блок исследования (внебольничная пневмония и острый аппендицит)
Оценка апоптоза мононуклеарных лейкоцитов в аннексиновом тесте с использованием проточной лазерной цитофлуориметрии	34	82	49
Определение уровня АФК в клетках с использованием проточной лазерной цитофлуориметрии	34	82	49
Оценка уровня митохондриального трансмембранного потенциала в мононуклеарных лейкоцитах с использованием проточной лазерной цитофлуориметрии	34	82	49
Определение количества TNFR1-презентирующих клеток с использованием проточной лазерной цитофлуориметрии	18	18	49
Исследование содержания факторов транскрипции (p53 и NF-κB) и белков-регуляторов апоптоза (Bad, Bax, Bcl-2, Bcl-X _L) с использованием метода вестерн-блоттинг	4	4	4
Оценка экспрессии мРНК генов белков-регуляторов апоптоза (bad, bax, bcl-2, bcl-X _L) с использованием метода RT-PCR	12	12	7
Исследование содержания TNFα в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов методом иммуноферментного анализа	11	11	22
Определение количества апоптотически измененных клеток TUNEL-методом	Не определяли	Не определяли	10

Методом проточной лазерной цитометрии с использованием цитометра Epics XL («Beckman Coulter», Франция) оценивали уровень внутриклеточной продукции АФК, количество апоптотически измененных клеток, содержание мононуклеарных лейкоцитов со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом и число TNFR1-презентирующих клеток. Оценку реализации апоптоза мононуклеарных лейкоцитов проводили с использованием ФИТЦ-меченного аннексина V («ANNEXIN V FITC» («Beckman Coulter», Франция)), обладающего сродством к мембранно-связанному фосфатидилсерину [Van Engeland M., 1998]. Для подтверждения наличия в исследуемой культуре клеток с апоптотическими изменениями применяли TUNEL-метод («Webstain», США). Количество клеток со сниженным уровнем потенциала митохондриальных мембран ($\Delta\psi$) регистрировали с использованием набора реагентов «MitoScreen» («BD Pharmingen», США). Уровень активных форм кислорода в клетках оценивали с помощью красителя с заблокированной флуоресценцией – дихлорфлуоресцеина диацетата («Sigma», США). Содержание мононуклеарных лейкоцитов, презентующих на своей поверхности мембранную форму рецептора к фактору некроза опухоли- α 1-го типа (TNF-RI) (CD120), определяли с помощью стандартных моноклональных антител к TNF-RI, меченных ФИТЦ («Immunotech», Франция).

Производство мононуклеарными лейкоцитами TNF α оценивали с помощью иммуноферментного анализа по инструкции, предлагаемой фирмой-производителем тест-систем («Протеиновый контур», Россия).

Для определения содержания транскрипционных факторов (NF- κ B, p53) и белков-регуляторов апоптоза (Bcl-2, Bcl-X_L, Bax, Bad) был использован метод вестерн-блоттинга. Клеточные экстракты получали путем лизиса клеток. Белки разделяли по молекулярной массе под действием электрического поля в течение 60 мин при напряжении 120 В. Для последующего исследования белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США). Перенос белков осуществлялся электрофоретически в течение 90 мин при силе тока 60 мА. Нитроцеллюлозные блоты инкубировали с первичными антителами к факторам транскрипции (p53 («Biosource», США), NF- κ B («Biosource», США)) и белкам-регуляторам (Bax («Biosource», США), Bcl-X_L («Sigma», США), Bad («Biosource», США), Bcl-2 («Biosource», США)) в разведении 1:200. В качестве стандарта и внутреннего контроля использовали белок глицеро-3-фосфат-дегидрогеназу («Chemicon», США).

Для количественного определения экспрессии РНК генов bcl-2, bax, bcl-X_L и bad использовали метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Выделение РНК из мононуклеаров крови осуществляли с применением гуанидин изотиоционата с последующей фенол-хлороформной экстракцией [Chomczynski P., Sacchi N., 1987]. Оценку качества выделенного препарата РНК проводили по итогам электрофоретического разделения. Возможные примеси геномной ДНК

удаляли при помощи пересадки в 2,5 М LiCl. Следующим шагом синтезировали ДНК на матрице РНК при участии обратной транскриптазы. Полученный фрагмент ДНК амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием SYBR Green I («Molecular Probe», США) на амплификаторе IQ5 («Bio-Rad», США). Амплификацию проводили с использованием режима, предполагающего предварительную денатурацию образцов (95°C, 2 мин) с последующими сорока циклами, включающими денатурацию (95°C, 15 сек) и отжиг (60°C, 45 сек). Праймеры, позволяющие специфично амплифицировать фрагменты кДНК генов *bcl-2*, *bcl-X_L*, *bax* и *bad*, были предоставлены лабораторией фармакогеномики НИИ химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск). Для определения относительного количества кДНК в образце использовали критерий ddCt.

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез [Лакин Г.Ф., 1980]. Для каждой выборки вычисляли средневыворочные характеристики: среднее арифметическое, среднее квадратичное отклонение, ошибка среднего или медиана, первый и третий квартили. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выворочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. В случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением для оценки различий между зависимыми выборками применяли непараметрический критерий Вилкоксона. Для оценки достоверности различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни. Наличие связи между изученными показателями проводили с использованием корреляционного анализа по методу Спирмена. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [Лакин Г.Ф., 1980].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Апоптотическая гибель клеток является механизмом, ответственным за поддержание постоянства численности клеточных популяций. Регуляция летальной программы представляет собой хорошо отлаженную систему взаимодействия про- и антиапоптогенных факторов. Сигнальные каскады, участвующие в регуляции апоптоза, такие как фосфорилирование белков, активация факторов транскрипции и их связывание со специфическими сайтами ДНК, контролируются внутриклеточным редокс-гомеостазом. При этом универсальными индукторами изменений окислительно-восстановительного статуса в ответ на стрессовые воздействия являются АФК [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006]. Интенсивная продукция АФК при различных патологических процессах и состояниях может оказывать влияние на процессы реализации

апоптоза (как в сторону активации, так и в сторону ингибирования), выступая в качестве патогенетического механизма развития социально значимых заболеваний [Дубинина Е.Е., 2001].

На первом этапе нашего исследования проводилась проверка гипотезы о влиянии окислительного стресса на процесс апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови в условиях *in vitro* и в клинике острого воспаления.

Известно, что для моделирования окислительного стресса используются различные методологические подходы. В частности, увеличение продукции АФК может быть достигнуто при добавлении в культуру клеток ксантина (за счет продукции супероксид радикала в ксантин-ксантинооксидазной реакции) [Забарова И.В. и соавт., 2004], TNF–лиганда и стауроспорина [Плетюшкина О.Ю. и соавт., 2006]. К широко используемым агентам, вызывающим в клетках окислительный стресс, относится перекись водорода. Данное вещество является стабильной молекулой, генерируется клетками как побочный продукт работы цепи окислительного фосфорилирования и, благодаря своим липофильным свойствам, легко проникает через клеточные мембраны [Гамалей И.А., Клыбин И.В., 1998; Тронов В.А., Константинов Е.М., 2000; Скулачев В.П., 2001]. Оценка содержания АФК в клетках при добавлении в культуральную среду перекиси водорода в диапазоне концентраций от 10 до 500 мкМ не выявила значимых отклонений исследуемого показателя от аналогичного параметра в контроле ($p > 0,05$) (рис. 1а). Полученные нами данные свидетельствуют о сохранении баланса между анти- и прооксидантными системами мононуклеарных лейкоцитов при воздействии указанных концентраций перекиси водорода. Однако результаты проведенного нами исследования показали, что добавление перекиси водорода в конечной концентрации 1 мМ в культуру мононуклеарных лейкоцитов приводило к повышению внутриклеточной продукции АФК в 2,5 раза ($p < 0,05$) (рис. 1а).

Развитие окислительного стресса является одним из патогенетических звеньев различных заболеваний, при этом механизмы генерации АФК являются однотипными. Отличительные особенности образования внутриклеточных АФК можно выявить только на начальных стадиях развития болезни [Дубинина Е.Е., 2001]. В проведенном нами исследовании влияние дисбаланса окислительного метаболизма на программированную гибель мононуклеарных лейкоцитов оценивали на модели острого воспаления (внебольничная пневмония и острый аппендицит). Анализ уровня АФК в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у пациентов с острым воспалением, показал увеличение значений указанного параметра по сравнению с таковым в клетках у здоровых доноров в 2,1 раза ($p < 0,05$) (рис. 1а). Известно, что воспалительный процесс в тканях сопровождается значительной продукцией АФК и прежде всего наиболее стабильной их формы - перекиси водорода [Крыжановский Г.Н., 2002]. Образованная при

«дыхательном взрыве» перекись водорода может проникать в рядом расположенные клетки, вызывая в них увеличение продукции АФК за счет разобщения окислительного фосфорилирования. Распространяясь таким образом на значительные расстояния в отсутствие прямых межклеточных контактов, H_2O_2 приводит к изменениям структуры и функции клеток крови, в частности, к зарегистрированному нами повышению продукции АФК мононуклеарными лейкоцитами крови, полученными у больных острыми воспалительными заболеваниями.

Наряду с окислительным стрессом, апоптоз также относится к категории типовых универсальных механизмов дизрегуляции клеточного гомеостаза, что позволяет предположить их взаимозависимость и участие АФК в регуляции клеточного саморазрушения [Зенков Н.К. и соавт., 2001].

В результате проведенного нами исследования показано, что добавление в культуральную среду малых концентраций перекиси водорода (10-500 мкМ) не вызывало достоверных изменений количества апоптотически измененных клеток ($p > 0,05$) (рис. 1б). Полученные данные соотносятся с приведенными выше результатами, свидетельствующими о том, что указанные концентрации H_2O_2 не изменяют клеточный редокс-статус и, следовательно, не приводят к запуску редокс-чувствительных систем, участвующих в трансдукции апоптотического сигнала.

Воздействие 1 мМ перекиси водорода на мононуклеарные лейкоциты крови здоровых доноров, напротив, приводило к увеличению числа аннексин-положительных клеток в 9,6 раз ($p < 0,05$) по сравнению с контролем на фоне повышения уровня внутриклеточной продукции АФК (рис. 1б). Выявленные изменения при экспериментальном окислительном стрессе подтверждают факт участия АФК в индукции и передаче апоптотического сигнала.

В результате исследования количества апоптотически измененных мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови у пациентов с внебольничной пневмонией и острым аппендицитом, было продемонстрировано повышение данного показателя в 7,3 и 7,7 раза, соответственно, по сравнению с нормой ($p < 0,05$) (рис. 1б). Влияние окислительного стресса на развитие апоптоза мононуклеарных лейкоцитов подтверждалось наличием положительной корреляции между повышением уровня АФК и возрастанием количества аннексин-положительных мононуклеарных лейкоцитов при экспериментальном окислительном стрессе ($r = 0,84$, $p < 0,05$) и острых воспалительных заболеваниях ($r = 0,71$, $p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение внутриклеточной продукции АФК является одним из ведущих факторов интенсификации апоптоза мононуклеарных лейкоцитов при воспалении.

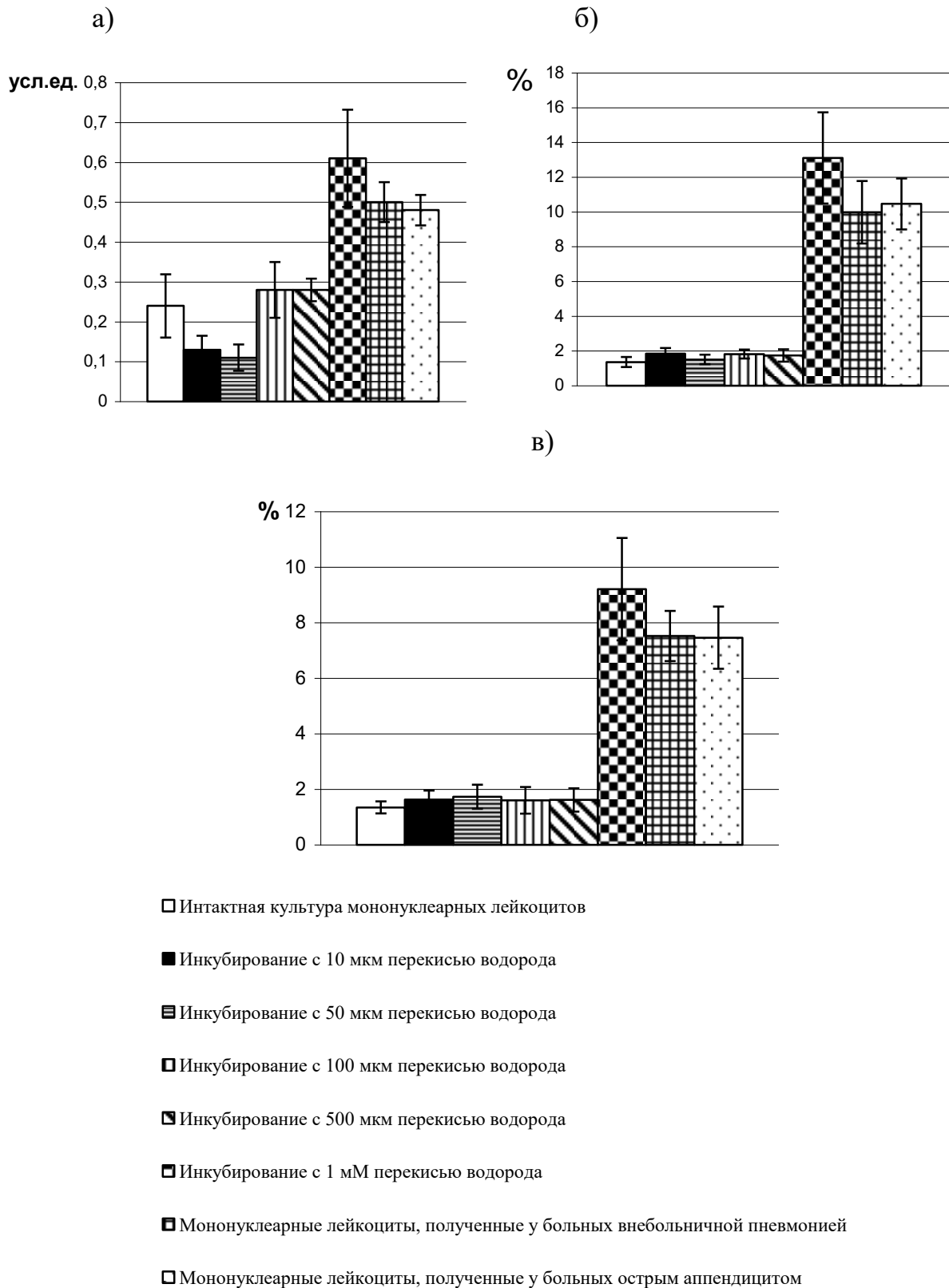


Рис.1. Внутриклеточное содержание активных форм кислорода (а), количество апоптотически измененных клеток (б) и мононуклеарных лейкоцитов крови со сниженным трансмембранным потенциалом (в) в условиях культивирования *in vitro* с различными концентрациями перекиси водорода

Известно, что запрограммированная гибель клеток включает в себя три последовательных стадии: инициация, эффекторный этап и деградация

[Kroemer G. et al., 1995; Marchetti P. et al., 1996]. Если последние две фазы носят типовой характер, то запуск и регуляция начальной стадии программированной гибели представляется сложным и многоуровневым процессом. Поскольку исследование различных путей инициации апоптоза способствует более глубокому пониманию механизмов его дисрегуляции в условиях окислительного стресса, мы оценивали основные варианты запуска программированной гибели клеток: митохондриальный, рецепторный (TNF α -опосредованный) и ядерный (p53-опосредованный).

В настоящее время накоплено большое количество данных, указывающих на существование взаимосвязи между генерацией АФК, функцией митохондрий и реализацией апоптоза [Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В., 2007]. Проведенное нами исследование показало, что добавление в культуральную среду H₂O₂ в диапазоне концентраций от 10 до 500 мкМ не вызывало изменений уровня митохондриального трансмембранного потенциала мононуклеарных лейкоцитов ($p > 0,05$), число аннексин-положительных клеток также не изменялось (рис. 1 б, в). В соответствии с гипотезой J.J. Lemasters et al. [1998], уменьшение $\Delta\psi$ в результате повышения проницаемости наружной митохондриальной мембраны является критическим фактором для развития апоптоза. Было показано, что число клеток со сниженным трансмембранным потенциалом после воздействия 1 мМ перекиси водорода превышало аналогичные значения в контроле в 6,8 раза ($p < 0,05$) (рис. 1в), свидетельствуя об активации программированной гибели клеток по митохондриальному пути в условиях окислительного стресса. Оценка количества мононуклеарных лейкоцитов со сниженным $\Delta\psi$ показала, что данный показатель при остром воспалении был в 5,6 раза выше аналогичного параметра в контроле ($p < 0,05$) и не отличался от такового в случае экспериментального окислительного стресса ($p > 0,05$) (рис. 1в). Предположение об индукции апоптоза по митохондриальному пути в условиях окислительного стресса подтверждалось наличием положительной корреляции между увеличением числа апоптотически измененных клеток и возрастанием количества мононуклеарных лейкоцитов со сниженным $\Delta\psi$ при окислительном стрессе *in vitro* ($r = 0,78$, $p < 0,05$) и остром воспалении ($r = 0,69$, $p < 0,05$). Интерпретируя полученные результаты, можно сделать вывод о том, что в условиях усиленной внутриклеточной продукции АФК передача сигнала апоптоза сопряжена с дисфункцией митохондрий, выражающейся в повышении проницаемости их мембран и снижении $\Delta\psi$.

В условиях дисбаланса окислительного метаболизма запускается еще один путь инициации программированной клеточной гибели, который обуславливает элиминацию клеток с определенной специфичностью рецепторов. Проведенное нами исследование выявило увеличение в (4,7 раза) количества TNFR1-презентирующих клеток в случае воздействия на культуру мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* 1 мМ перекиси водорода ($p < 0,05$). Численность TNFR1-экспрессирующих клеток, выделенных из

крови у больных острыми воспалительными заболеваниями, превышала в 4,5 раза соответствующие параметры в интактной культуре ($p < 0,05$) (рис. 2а). Полученные нами данные свидетельствуют о повышенной готовности клеток к запуску апоптотической программы по рецепторному пути в условиях окислительного стресса.

Оценив готовность клеток к $TNF\alpha$ -опосредованному апоптозу, для нас представлялось целесообразным установить присутствие соответствующего лиганда - $TNF\alpha$, запускающего внутриклеточный каскад, приводящий к активации каспаз.

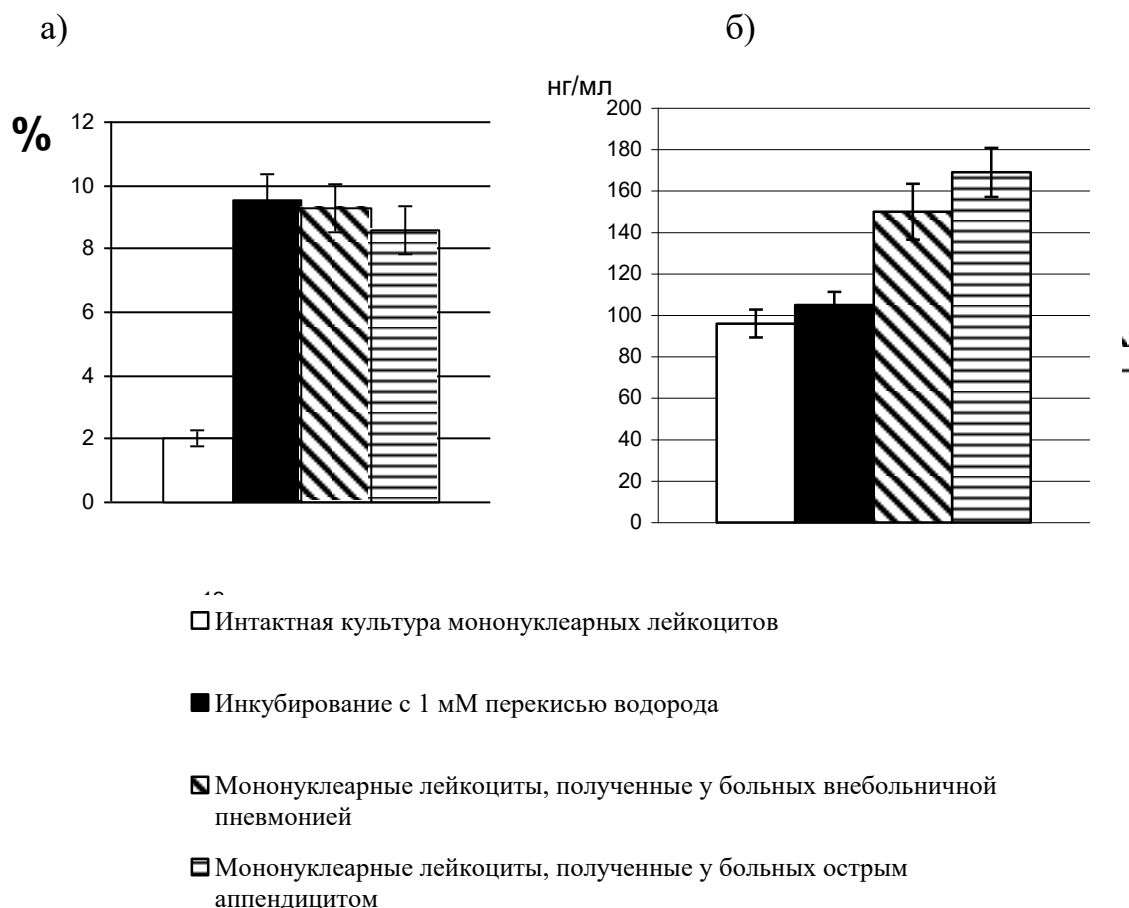


Рис.2. Содержание $TNFR1$ -презентирующих клеток (а) и уровень $TNF\alpha$ в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови (б) при экспериментальном окислительном стрессе и у больных острыми воспалительными заболеваниями

В проведенных нами исследованиях анализ уровня продукции $TNF\alpha$ показал, что величина этого показателя повышалась в 1,6 раза лишь в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у больных острым воспалением ($p < 0,05$), но не изменялась относительно контроля при окислительном стрессе *in vitro* ($p > 0,05$) (рис. 2б). Отсутствие изменений продукции $TNF\alpha$ в условиях окислительного стресса наводит на мысль об отсутствии вовлеченности редокс-сигнальных систем в наработку этого цитокина. Поскольку воспаление представляет собой сложный многокомпонентный процесс, можно предполагать вовлечение

других факторов (опосредованных цАМФ, цГМФ, Ca^{2+} , арахидоновой кислотой и др.) в активацию продукции TNF α при острых воспалительных заболеваниях.

Установлено, что одной из мишеней АФК в клетке являются нуклеиновые кислоты [Raha S., Robinson V.H., 2000]. Повреждение ДНК, обуславливающее активацию гена p53, может приводить к запуску ядерного пути апоптоза, репарации ДНК, аресту клеточного деления и старению клетки [Чумаков П.М., 2000]. Мы выявили присутствие p53 в клетках, выделенных из периферической крови у здоровых доноров, после воздействия на них *in vitro* 1мМ H₂O₂. Таким образом, полученные в проведенном нами исследовании данные свидетельствуют о том, что возрастание уровня АФК в мононуклеарных лейкоцитах крови сопряжено с активацией митохондриального и ядерного вариантов запуска апоптотической гибели, а также с повышенной готовностью инициации рецепторного пути регуляции запрограммированной клеточной гибели. В связи с этим особый интерес для нас представляло изучение молекулярных механизмов реализации суицидальной программы клеток в условиях окислительного стресса.

АФК могут влиять на жизнеспособность клетки, нарушая экспрессию генов за счет транскрипционных факторов, которые связываются с регионами генов-мишеней и изменяют их транскрипцию. Одним из важнейших редокс-регулируемых транскрипционных факторов, участвующих в реализации апоптотической гибели, является p53. Под контролем p53 находится огромное число генов, белковые продукты которых в ответ на различные стрессорные воздействия индуцируют апоптоз, клеточное старение или арест деления клетки [Hoh J. et al., 2002]. Методом вестерн-блоттинга нами было зарегистрировано появление p53 в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, после воздействия на клетки перекиси водорода в концентрации 1мМ; примечательно, что данный белок отсутствовал в контроле и в клетках, полученных у больных пневмонией. По данным литературы, p53 имеет короткий период полужизни и, в зависимости от типа клеток и природы стрессового сигнала, инактивируется в течение 6-20 мин MDM2 убиквитин-лигазой [Dornan D. et al., 2004]. Отсутствие p53 в мононуклеарах, выделенных из периферической крови у больных внебольничной пневмонией, несмотря на высокий уровень внутриклеточной продукции АФК, может быть обусловлено, на наш взгляд, образованием комплекса p53-MDM2 в результате более продолжительного, по сравнению с экспериментальной моделью, нарушения окислительного баланса в организме.

Другим важнейшим транскрипционным фактором, активирующимся в условиях окислительного стресса, является NF-kB [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006]. Данный протеин играет существенную роль в регуляции иммунного ответа, воспалительной реакции, а также в контроле клеточного деления и апоптоза [Pahl H.L., 1999; Haddad J., 2002;

Kucharczak J. et al, 2003; Bonizzi G., Karin M., 2004; Hayden M.S., Ghosh S., 2004]. Транскрипционный фактор NF- κ B сформирован из нескольких субъединиц (чаще всего из p50/RelA(p65) частиц) [Hayden M.S., Ghosh S., 2004]. Анализ содержания p65 субъединицы в мононуклеарных лейкоцитах показал, что данный белок появляется в клетках, полученных у здоровых доноров, после воздействия на них 1 мМ H₂O₂ и присутствует в мононуклеарных лейкоцитах, выделенных из крови у больных внебольничной пневмонией. Индукция NF- κ B происходит при высвобождении p65 частицы из комплекса с ингибитором за счет фосфорилирования последнего I κ B киназным комплексом. Подобный «классический» вариант активации наблюдается при воздействии воспалительных цитокинов, таких как TNF- α и IL-1, под влиянием бактериальной инфекции и липополисахаридов [Haddad J., 2002]. Также активация NF- κ B может быть опосредована каскадом TNF α -TNFR1-TRADD-RIP-NIK-киназа-NF- κ B и атипичными индукторами (УФ-излучение, гипоксия/реоксигенация, перекись водорода, лекарственные вещества) [Mukhopadhyay A. et al., 2000; Vui N.T. et al., 2001; Bonizzi G., Karin M., 2004; Hayden M.S., Ghosh S., 2004]. При добавлении экзогенной перекиси водорода в культуру клеток, полученных у здоровых доноров и больных острым воспалением, в мононуклеарных лейкоцитах происходило появление активной формы NF- κ B. Полученные результаты позволяют предполагать доминирующую роль АФК в индукции данного транскрипционного фактора при дисбалансе окислительного метаболизма. Возможно, активирующие сигналы при остром воспалении (TNF- α , бактериальные липополисахариды), наряду с АФК, приводят к высвобождению NF- κ B из комплекса с ингибитором. Однако показано, что p65 субъединица вызывает индукцию генетической транскрипции I κ B частицы, которая может связаться с NF- κ B и вернуть его в неактивное состояние [Hayden M.S., Ghosh S., 2004; Viatour P. et al., 2005]. Подобная негативная регуляция функции NF- κ B может объяснять одинаковый уровень данного транскрипционного фактора при экспериментальном окислительном стрессе и остром воспалении.

Таким образом, в нашей работе продемонстрирована редокс-зависимая активация NF- κ B – фактора, ответственного за выживание клеток и пролиферацию [Kucharczak J. et al., 2003; Perkins N.D., 2004], и p53, индуцирующего апоптоз [Schmitt C.A. et al., 2002; Soussi T., 2005; Levine A. et.al., 2006], на что указывало появление p53 и активной формы NF- κ B в мононуклеарных лейкоцитах крови под действием 1 мМ перекиси водорода. Однако, как свидетельствуют полученные ранее данные, результирующим вектором активации p53 и NF- κ B является повышение апоптотической реакции клеток, что свидетельствует о неэффективности антисуицидальной регуляции NF- κ B. Показано, что указанные транскрипционные факторы конкурируют между собой за один пул генов–коактиваторов, поэтому недостаток транскрипционной активности

NF- κ B связывают с ее повышением для p53 [Mattson M.P., Meffert M.K., 2006].

В литературе существует ряд гипотез, объясняющих отсутствие антиапоптотического эффекта активации NF- κ B. Так, по данным N.D. Perkins, T.D. Gilmore [2006], функция NF- κ B из антиапоптотической может трансформироваться в проапоптотическую в зависимости от природы индуцирующего сигнала. Существует другая гипотеза, объясняющая проапоптотическую роль NF- κ B под действием ряда стимулов (например, УФ-радиация, доксорубицин). Показано, что высвобождение RelA субъединицы из комплекса с ингибитором является лишь первым этапом функционирования NF- κ B. Вторая фаза заключается в перемещении транскрипционного фактора из цитоплазмы в ядро, при котором может происходить модификация NF- κ B, приводящая к изменению его транскрипционного потенциала [Chen L.F., Greene W.C., 2004]. В данном случае анализ транскрипционной активности NF- κ B может осуществляться за счет измерения ответа генов–мишеней [Ho W.C. et al., 2005].

Одним из генов, являющихся мишенью NF- κ B, считается bcl-X_L, кодирующий белок с антиапоптотической функцией и относящийся к семейству Bcl-2 [Kucharczak J. et al., 2003]. Данное семейство представляет собой многочисленную группу протеинов, участвующих в регуляции апоптоза и выполняющих как про-, так и антиапоптотическую функцию [Borner C., 2003; Cory S. et al., 2003]. С использованием метода ПЦР в реальном времени нами было показано повышение уровня экспрессии мРНК гена bcl-X_L в условиях окислительного стресса *in vitro* и при остром воспалении (в 2,8 и 1,8 раза, соответственно) ($p < 0,05$) (рис. 3). Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что активация NF- κ B приводит к индукции антисуицидальных генов-мишеней. Однако, несмотря на адекватную стимуляцию NF- κ B-зависимого антиапоптотического ответа, мононуклеарные лейкоциты вступают на путь программированной гибели в условиях увеличения внутриклеточной АФК-продукции. В результате проведенного анализа уровня белка Bcl-X_L методом вестерн-блоттинга обнаружено, что содержание данного протеина в условиях окислительного стресса относительно контроля не изменялось. Полученные данные, вероятно, правомерно объяснить посттрансляционной модификацией Bcl-X_L, приводящей к изменению его нативной структуры и функции. В частности, возможно ингибирование указанного белка в результате фосфорилирования или взаимодействия с регуляторными ВНЗ-протеинами [Willis S.N. et al., 2005].

Анализ уровня экспрессии мРНК гена bcl-2 и содержания белкового продукта данного гена в мононуклеарных лейкоцитах показал, что оба параметра не изменялись по сравнению с контролем в случае воздействия H₂O₂ на клетки здоровых доноров и в мононуклеарных лейкоцитах у больных острым воспалением ($p > 0,05$) (рис. 3). Описанные результаты

исследования, проведенного с использованием методов RT-PCR и вестерн-блоттинга, свидетельствуют об отсутствии редокс-чувствительного механизма регуляции активности указанного протеина. Отсутствие адекватного увеличения содержания в клетках антисуицидальных белков Bcl-X_L и Bcl-2 в ответ на апоптогенный стимул при экспериментальном окислительном стрессе и остром воспалении может быть причиной зарегистрированного повышения количества аннексин-положительных мононуклеарных лейкоцитов (рис. 1б).

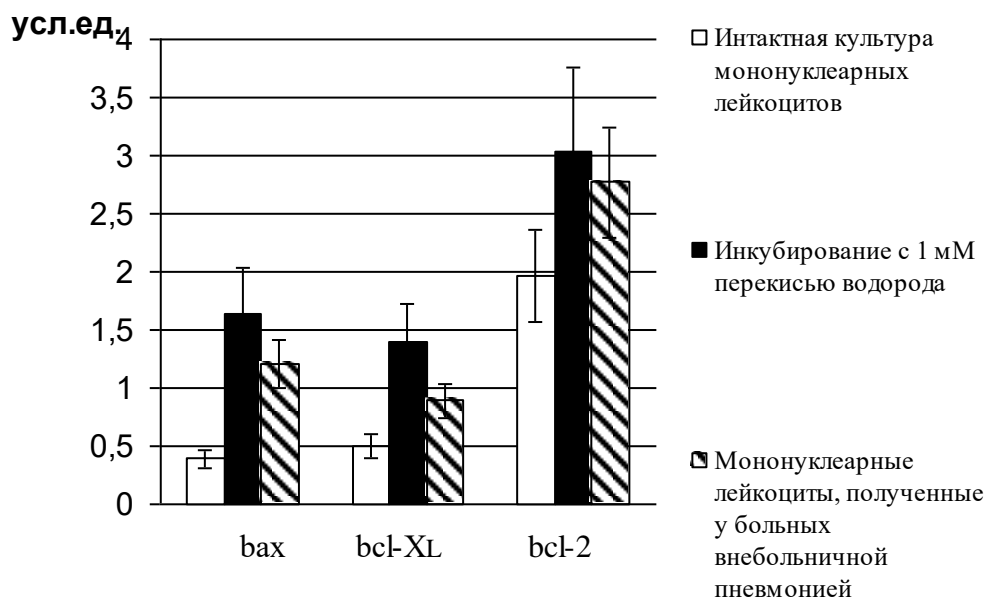


Рис.3 Уровень экспрессии мРНК (усл.ед.) генов *bax*, *bcl-X_L*, *bcl-2* в мононуклеарных лейкоцитах крови у здоровых доноров, при экспериментальном окислительном стрессе и у больных внебольничной пневмонией

Оценка уровня экспрессии мРНК гена *bax* показала увеличение исследованного параметра при окислительном стрессе *in vitro* в 4,2 раза, в случае острого воспаления в - 3,1 раза по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре ($p < 0,05$) (рис. 3). Известно, что ген *bax* является мишенью транскрипционного фактора p53 [Sax J.K. et al., 2002], в связи с чем увеличение экспрессии указанного гена свидетельствует об эффективной трансактивационной функции p53 в условиях дисбаланса окислительного метаболизма. При этом отсутствие различий экспрессии *bax* при окислительном стрессе *in vitro* и в случае острого воспаления позволяет предположить схожий механизм активации p53 в обеих ситуациях, несмотря на отсутствие белка p53 (за счет образования комплекса p53-MDM2) в мононуклеарных клетках крови, полученных у больных внебольничной пневмонией.

Исследование уровня проапоптогенного белка Вах методом вестерн-блоттинга показало повышение содержания данного протеина в мононуклеарных лейкоцитах крови, полученных у здоровых доноров,

после инкубации с 1мМ Н₂О₂ и в клетках у больных острым воспалением. Вах содействует запуску программированной клеточной гибели, благодаря своей способности олигомеризоваться и формировать поры в мембранах. Показано, что в отсутствии стрессовых воздействий данный белок находится в растворимой форме в цитозоле клеток. В ответ на апоптотический стимул Вах подвергается конформационным перестройкам на С- и N-конце, транслоцируется на внешнюю митохондриальную мембрану и формирует олигомерный комплекс [Hsu Y.T. et al., 1997; Antonsson B. et al., 2001; Mikhailov V. et al., 2001; Nechushtan A. et al., 2001]. Последний представляет собой канал (МАС) с новыми свойствами, который не включает преобладающие поры внешней мембраны VDAC и TOM (translocase outer membrane), содержит протеин Вах; при этом свойства МАС неотличимы от олигомеризованного Вах в свободных от белков синтетических мембранах [Pavlov E.V. et al., 2001; Dejean L.M. et al., 2005]. Вах может участвовать также в формировании пор пермеабилезационного перехода, образованных VDAC, ANT и циклофилином D [Adachi M. et al., 2004].

Важную роль в регуляции взаимоотношений между анти- и проапоптотическими белками семейства Bcl-2 играет группа BH3-только протеинов (Bad, Bim, tBid, Puma, Noxa и др.), также принадлежащая данному семейству. Нами была проведена оценка экспрессии мРНК гена bad и содержания белка Bad в мононуклеарных лейкоцитах у здоровых доноров, в условиях окислительного стресса *in vitro* и в клетках у больных острым воспалением, показавшая отсутствие экспрессии данного протеина при указанных условиях. Полученные данные свидетельствуют, что при окислительном стрессе не происходит активации транскрипции гена bad.

Подытоживая представленный выше фактический материал, следует подчеркнуть, что в настоящей работе были определены несколько ключевых молекулярных мишеней (факторы транскрипции, белки-регуляторы апоптоза), участвующих в редокс-опосредованной регуляции суицидальной программы клеток. Управление программированной гибелью клеток с помощью воздействия на сигнал-передающие пути позволит создать патогенетически обоснованные подходы терапии социально значимых заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом и дисрегуляцией программированной гибели клеток.

ВЫВОДЫ

1. Окислительный стресс, индуцированный *in vitro* 1 мМ перекисью водорода и развивающийся при остром воспалении, сопровождается увеличением числа апоптотически измененных мононуклеарных клеток крови.

2. Воздействие активных форм кислорода на мононуклеарные лейкоциты сопровождается повышением содержания в клетках проапоптотического белка Вах, не приводит к изменению содержания

антисуицидальных белков Bcl-2 и Bcl-X_L, проапоптотический белок Bad в клетках отсутствует.

3. В условиях экспериментального окислительного стресса повышается экспрессия генов bcl-X_L и bax, экспрессия мРНК гена bcl-2 не изменяется; ген bad при окислительном стрессе *in vitro* не экспрессируется.

4. При культивировании мононуклеарных лейкоцитов крови в присутствии 1 мМ перекиси водорода происходит активация транскрипционных факторов p53 и NF-κB, приводящая к изменению экспрессии генов-мишеней bcl-X_L и bax.

5. При острых воспалительных заболеваниях имеет место дисбаланс белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2 (увеличение содержания Bax без изменения уровня Bcl-2 и Bcl-X_L) на фоне повышенной экспрессии мРНК генов bcl-X_L и bax и активации фактора транскрипции NF-κB.

6. Влияние активных форм кислорода на апоптотическую программу мононуклеарных лейкоцитов опосредовано редокс-чувствительными транскрипционными факторами и приводит к дизрегуляции запрограммированной гибели клеток за счет изменения соотношения белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Часовских, Н.Ю. Влияние окислительного стресса на реализацию апоптотической программы мононуклеаров периферической крови в условиях *in vitro* / Н.Ю. Часовских, Е.Г. Старикова, Е.В. Кайгородова // Материалы межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» - г. Санкт-Петербург, 24-25 апреля 2007. - Санкт-Петербург, 2007. – С. 139.

2. Часовских, Н.Ю. TNF-1 опосредованный и митохондриальный пути запуска апоптотической программы в условиях окислительного стресса *in vitro* / Н.Ю. Часовских, Е.Г. Старикова, Е.В. Кайгородова // Материалы межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» - г. Санкт-Петербург, 24-25 апреля 2007. - Санкт-Петербург, 2007. – С. 141.

3. Старикова, Е.Г. Роль белков семейства Bcl-2 в дизрегуляции апоптоза мононуклеаров в условиях окислительного стресса *in vitro* и при остром воспалении / Е.Г. Старикова, Е.В. Кайгородова // Материалы VII конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» г.Томск, 17-18 мая 2007.- Томск, 2007.- С. 202-203.

4. Часовских, Н.Ю. Молекулярные механизмы реализации апоптотической программы мононуклеаров в условиях окислительного стресса *in vitro* и при остром воспалении / Н.Ю. Часовских, Е.Г. Старикова

// Материалы VII конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» г.Томск, 17-18 мая 2007.- Томск, 2007.- С. 208-209.

5. Митохондриальный, TNF- и p53–опосредованные пути реализации апоптотической программы мононуклеаров в условиях окислительного стресса *in vitro* и при остром воспалении / Часовских Н. Ю., Старикова Е.Г., Кайгородова Е.В. и др. // Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины» - г. Абакан, 17-19 мая 2007. – Абакан, 2007.- С. 29 – 30.

6. Дизрегуляция летальной программы мононуклеаров в условиях окислительного стресса / Часовских Н.Ю., Старикова Е.Г., Стариков Ю.В. и др. // Материалы III всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов». - г.Новосибирск, 7–9 ноября 2007. – Медико-фармацевтический журнал. – Новосибирск, 2007. – С.85.

7. Модуляция апоптоза мононуклеаров в условиях окислительного стресса / Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Часовских Н.Ю. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. - №3.- С. 251-254.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода
 ФИТЦ - флюоресцеинизотиоцианат
 УФ-излучение – ультрафиолетовое излучение
 ANT – транслокатор адениловых нуклеотидов
 ИкВ – ингибитор карра В
 VDAS – порин-вольтаж зависимый канал

Автор выражает благодарность зав. кафедрой терапии и усовершенствования врачей Военно-медицинского института к.м.н. Т.С.Агеевой, зав. терапевтическим отделением ММЛПУ городской больницы №1 к.м.н. А.В. Дубоделовой, зав. хирургическим отделением ММЛПУ городской больницы №1 А.Я. Митасову за предоставление клинического материала, зав. лабораторией клинической иммунологии ГУЗ ЦМСЧ № 81 ЗАТО Северск к.м.н Т.Т. Радзивил, зав. лабораторией фармакогеномики НИИ химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск) к.б.н. М.Л. Филипенко за помощь в организации проведения исследований.

Автор выражает особую благодарность ассистенту кафедры ФОКМ ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава к.м.н Н. Ю. Часовских за ценные теоретические и методические советы.