

**УТКИН ОЛЕГ ВЛАДИМИРОВИЧ**

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА БЕЛКА  
FAS В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ  
АЛЬТЕРИРУЮЩИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ НА ОРГАНИЗМ**

**03.00.04 – биохимия**

**03.00.13 – физиология**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Нижний Новгород**

**2007**

Работа выполнена в Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского и Нижегородском НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной.

**Научные руководители:**

доктор биологических наук, профессор В.В. Новиков

доктор медицинских наук А.В. Алясова

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор К.Н. Конторщикова

доктор биологических наук, профессор А.Е. Хомутов

**Ведущая организация:**

Государственное учреждение Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН

Защита состоится «27» сентября 2007 года в «13» часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 при Нижегородском госуниверситете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ННГУ

Автореферат разослан «6» августа 2007 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доцент, к.б.н.

А.С. Корягин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Программируемая гибель клеток (апоптоз) необходима для нормального развития и существования многоклеточных организмов (Abastado, 1996). Путем апоптоза происходит удаление клеток, выживание которых нежелательно для организма, например, злокачественно трансформированных клеток или клеток, зараженных вирусом.

Одним из рецепторов, инициирующих программируемую клеточную гибель, является Fas (CD95) протеин. Молекула CD95 экспрессируется на мембране клеток различных типов и участвует в передаче апоптотического сигнала. Помимо мембранной формы (mFas/mCD95) описаны растворимые формы Fas белка (sFas/sCD95), образующиеся в результате альтернативного сплайсинга мРНК. Среди них выделяют доминирующий вариант молекулы, образующийся в результате делеции 6 экзона, кодирующего трансмембранный домен (FasExo6Del/FasTMDel). Остальные (минорные) формы образуются в результате единичных или комбинированных делеций разных экзонов (Paroff et al., 1996). Растворимые продукты трансляции альтернативных форм мРНК Fas белка модулируют апоптотический сигнал в зависимости от степени олигомеризации. Мономерные растворимые формы CD95 протеина ингибируют апоптоз, тогда как олигомерная форма проявляет цитотоксические свойства (Proussakova et al., 2003). Кроме того, существование большого количества альтернативных форм растворимого Fas белка позволяет предположить наличие регуляции начальных стадий апоптоза за счет повышения или снижения их экспрессии. Однако характер экспрессии минорных растворимых форм в разных типах клеток и механизмы их возможного участия в регуляции апоптоза не выяснены и требуют детального изучения.

## **Цель исследования**

Исследовать особенности спектра альтернативных форм мРНК CD95 протеина в сопоставлении с сывороточным уровнем растворимого Fas белка при различных альтерирующих воздействиях на организм.

## **Задачи**

1. Изучить особенности изменения спектра альтернативных форм мРНК Fas белка в мононуклеарных клетках периферической крови и гепатоцитах при хронических вирусных гепатитах В и С, в мононуклеарных клетках крови и клетках опухолевого очага при раке молочной железы и в мононуклеарных клетках при ожоговой травме.
2. Оценить уровень экспрессии мРНК мембранной и доминирующей растворимой форм CD95 протеина в мононуклеарных клетках крови и клетках печени при вирусных гепатитах В и С и в мононуклеарных клетках крови при ожоговой травме.
3. Осуществить сравнительный анализ взаимоотношений между спектром и количественным содержанием альтернативных форм мРНК CD95 протеина в клетках и содержанием суммарной и олигомерной фракций растворимого Fas белка в сыворотке крови при вирусных гепатитах, раке молочной железы и ожогах.
4. Провести сравнительный анализ взаимоотношений между изменениями в спектре альтернативных форм мРНК Fas белка в мононуклеарных клетках и содержанием CD95-положительных клеток периферической крови при вирусных гепатитах В и С, раке молочной железы и ожоговой травме.

## **Научная новизна**

Впервые при вирусных гепатитах В и С, раке молочной железы и ожоговой травме в мононуклеарных клетках крови выявлено уменьшение числа мРНК минорных альтернативных форм CD95 протеина, что сопровождается изменением сывороточной концентрации мономерной и олигомерной форм растворимого Fas белка.

Впервые установлено, что мононуклеарные клетки крови лиц с неблагоприятным исходом ожоговой болезни (погибшие), характеризовались достоверным снижением соотношения уровней экспрессии мРНК FasTMDel к мРНК mFas как по сравнению с группой лиц, имеющих благоприятный исход ожоговой болезни (выжившие), так и по сравнению с донорами.

Впервые показано, что на третьей и четвертой стадиях рака молочной железы наличие мРНК FasExo4,6Del и мРНК FasExo4Del в мононуклеарных клетках крови сопровождалось достоверным снижением сывороточного содержания олигомерного растворимого Fas белка. Впервые выявлено, что при вирусных гепатитах В и С отсутствие мРНК минорной FasExo3,4Del формы в мононуклеарных клетках периферической крови сопровождается достоверно повышенным сывороточным уровнем суммарного растворимого CD95 протеина.

Впервые обнаружено, что повышение сывороточного содержания суммарного sCD95 протеина при хроническом гепатите С ассоциировано с сохранением только одной минорной формы мРНК Fas белка (FasExo4Del) на фоне статистически достоверного повышения в гепатоцитах уровня экспрессии мРНК FasTMDel формы.

### **Практическая значимость работы**

Разработанный нами методический подход для отдельной детекции уровня экспрессии мРНК мембранной и доминирующей растворимой форм Fas белка с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени может быть использован для мониторинга течения ожоговой болезни и в качестве возможного прогностического критерия исхода заболевания. Используемые в работе подходы для дифференциальной детекции спектра альтернативных форм мРНК Fas белка могут применяться для оценки функционального состояния клеточного звена иммунитета при нарушениях гомеостаза организма. Полученные данные могут быть использованы в преподавании курсов по биохимии и иммунологии для студентов вузов биологического и медицинского профиля.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. При ожоговой травме изменение соотношения в уровнях экспрессии мРНК мембранной и доминирующей растворимой форм Fas белка наблюдается в мононуклеарных клетках лиц с неблагоприятным исходом ожоговой болезни.
2. При хроническом гепатите С повышение сывороточного содержания суммарного sCD95 происходит на фоне изменения числа минорных форм мРНК в мононуклеарных клетках крови, уровня экспрессии мРНК FasTMDel и соотношения мРНК мембранной и доминирующей растворимой форм Fas белка в клетках печени.
3. Достоверное снижение сывороточного уровня олигомерного sCD95 при раке молочной железы осуществляется на фоне изменения экспрессии мРНК альтернативных форм Fas белка, как в клетках периферической крови, так и в клетках опухолевого очага.

### **Апробация работы**

Результаты работы представлены на Российской научно-практической конференции «Узловые вопросы борьбы с инфекцией» (С.-Петербург, 2004), Международном конгрессе молодых ученых «Науки о человеке» (Томск, 2005), Третьем международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2005), XI Нижегородской сессии молодых ученых (Естественнонаучные дисциплины) (Нижний Новгород, 2006), 9-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2005), I съезде комбустиологов России (Москва, 2005), научной конференции «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний», посвященной 85-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной (Нижний Новгород, 2006), X Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2006).

Апробация диссертации состоялась на расширенном заседании кафедры молекулярной биологии и иммунологии ННГУ им. Н.И. Лобачевского, межлабораторного семинара Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной и Нижегородского отделения

Российского научного общества биохимиков и иммунологов 24 апреля 2007 года.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа в объеме 124 листов состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Диссертация иллюстрирована 22 рисунками и 10 таблицами. Библиографический указатель включает 159 источников литературы (23 отечественных и 136 иностранных).

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

В работе использовали образцы сыворотки и мононуклеарных клеток периферической крови 74 здоровых доноров. Средний возраст доноров составил 36 лет. Исследовано 20 образцов биопсии печени, 35 образцов сыворотки крови и 15 образцов мононуклеарных клеток крови, полученных от лиц, поступивших на лечение в Городскую инфекционную больницу № 2 г. Нижнего Новгорода. Материал был любезно предоставлен к.м.н. Отмаховой И.А. В работе также использовали 86 образцов сыворотки крови, 86 образцов мононуклеарных клеток периферической крови и 22 образца клеток опухолевого очага женщин в возрасте от 31 до 82 лет с гистологически подтвержденным диагнозом рака молочной железы, находящихся на лечении в Нижегородском областном онкологическом диспансере. Кроме того, в работе были использованы 156 образцов сыворотки крови и 156 образцов мононуклеарных клеток периферической крови лиц, проходивших лечение в отделении термической травмы взрослых Российского ожогового центра на базе Нижегородского НИИ травматологии и ортопедии. Их средний возраст составил 42 года. Общая площадь ожогового поражения составляла от 30 до 90 % поверхности тела. Исследования проводили в динамике от момента поступления пострадавших в стационар на первые, третьи и пятые сутки. В 19 случаях ожоговая болезнь привела к гибели пострадавших. Все диагнозы были

поставлены и верифицированы врачебными коллективами соответствующих учреждений.

Оценку спектра и уровня экспрессии альтернативных форм мРНК Fas белка проводили с помощью полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), и ОТ-ПЦР в реальном времени. При одновременном исследовании в одном образце уровня экспрессии мРНК mFas и Fas<sup>TM</sup>Del из номера порогового цикла sFas вычитали номер порогового цикла mFas, получали разницу значимых циклов амплификации (РЗЦА). Относительные цифровые значения позволяли избежать ошибок, связанных с неизбежным различным количеством мРНК Fas белка в исследуемых образцах.

Сывороточное содержание суммарного растворимого CD95 протеина определяли с применением меченых пероксидазой хрена моноклональных антител (МКА) ИКО-160 и поликлональных антител против мембранных белков мононуклеарных клеток периферической крови человека, используемых в качестве «первых» антител и сорбируемых в лунки планшетов для иммуноферментного анализа. Для исследования уровня олигомерной фракции растворимого Fas белка в качестве первых антител использовали очищенные МКА ИКО-160, в качестве вторых антител применяли МКА ИКО-160, меченые пероксидазой хрена. Относительное содержание CD95 (Fas)-положительных мононуклеарных клеток оценивали в реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием МКА ИКО-160 и ФИТЦ-меченых поликлональных антител против мышинных иммуноглобулинов. Использовали МКА, полученные в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина РАМН.

Маркеры вирусных гепатитов определяли с помощью иммуноферментных тест-систем фирмы «Диагностические системы» (г. Нижний Новгород).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ BIOSTAT и Statistica v. 6.0. Нормальность распределения данных проверяли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Дальнейший анализ проводили с использованием критериев Манна-Уитни, Стьюдента с поправкой Бонферрони и критерия ранговой корреляции Спирмена.



## Результаты и их обсуждение

В настоящей работе определен спектр альтернативных форм мРНК Fas белка, уровень экспрессии мРНК мембранной и доминирующей растворимой форм в сравнении с содержанием Fas белка в сыворотке крови, относительным содержанием Fas-положительных мононуклеарных клеток периферической крови при различных альтерирующих воздействиях на организм, характеризующихся разной степенью выраженности апоптотических реакций. Литературные данные свидетельствуют о том, что ожоговая травма характеризуется высокой степенью выраженности апоптотических реакций, рак молочной железы – угнетением процессов реализации программируемой клеточной смерти (Lebedev et al., 1999, Peter et al., 2005). В отношении напряженности апоптотических процессов при вирусных гепатитах В и С данные литературы весьма противоречивы (Ferenbach et al., 1997, Marusawa et al., 1999).

Как видно из рис. 1, в мононуклеарных клетках периферической крови здоровых доноров присутствует мРНК, кодирующая мембранную, доминирующую растворимую и 4 минорных растворимых формы Fas белка.

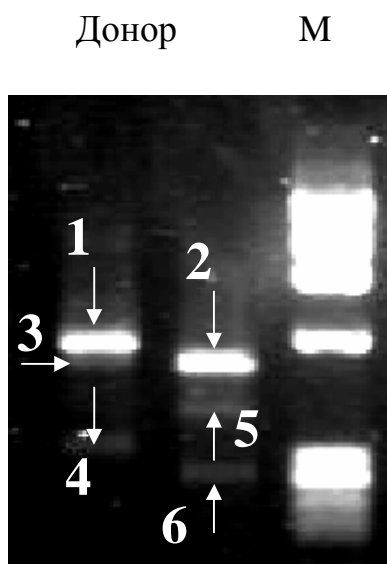


Рис. 1. Спектр форм мРНК Fas белка в мононуклеарных клетках крови здоровых доноров. 1 – mFas; 2 – FasTMDel; 3 – FasExo4Del; 4 – FasExo3,4Del; 5 – FasExo4,6Del; 6 – FasExo3,4,6Del; M – маркер молекулярных масс (ДНК фага φX 174 Нае III)

При хронических гепатитах В и С (ХГВ и ХГС) клетки печени содержали одну минорную форму мРНК (FasExo4Del), а также мРНК мембранной и доминирующей растворимой форм Fas белка (рис. 2).



Рис. 2. Электрофореграмма альтернативных форм мРНК Fas белка гепатоцитов при вирусных гепатитах В и С. 1 – mFas; 2 – FasTMDel; 3 – FasExo4Del

В мононуклеарных клетках периферической крови лиц при хроническом гепатите В и С детектировались три минорные формы мРНК (FasExo4Del, FasExo4,6Del и FasExo3,4,6Del) наряду с мРНК mFas и FasTMDel (рис. 3).

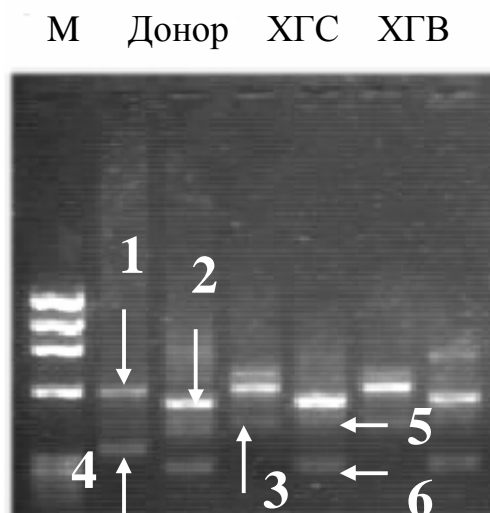


Рис. 3. Альтернативные формы мРНК Fas белка в мононуклеарных клетках периферической крови при вирусных гепатитах В и С. 1 – mFas; 2 – FasTMDel; 3 – FasExo4Del; 4 – FasExo3,4,6Del; 5 – FasExo4,6Del; 6 – FasExo3,4,6Del; М – маркер молекулярных масс (ДНК фага φХ 174 Нае III)

При раке молочной железы в мононуклеарных клетках крови на первой стадии развития неопластического процесса в 64% случаев обнаруживались две минорные формы мРНК Fas белка (FasExo4,6Del и FasExo4Del), а в 36% случаев одна минорная форма мРНК (FasExo4,6Del) (рис. 4).

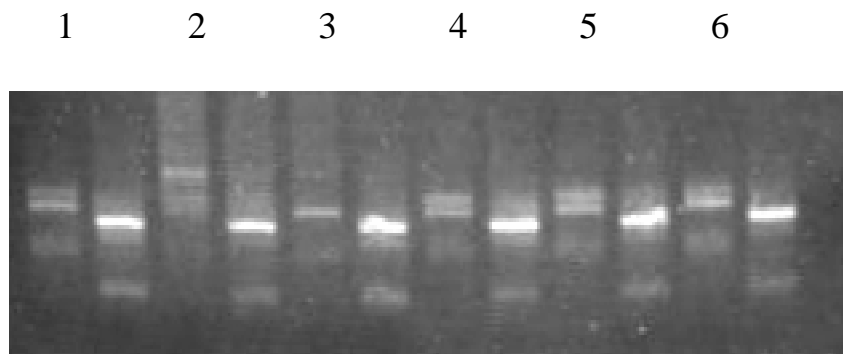


Рис. 4. Спектр форм мРНК Fas белка в мононуклеарных клетках крови при раке молочной железы

1,2 – первая стадия, 2 – вторая стадия, 3,4 – третья стадия, 5,6 – четвертая стадия

На второй, третьей и четвертой стадиях рака молочной железы во всех исследованных образцах мононуклеарных клеток крови были обнаружены две минорные формы мРНК (FasExo4,6Del и FasExo4Del). При этом на всех стадиях онкологического процесса детектировалась мРНК mFas и FasTMDel. В отличие от мононуклеарных клеток крови в опухолевых клетках мРНК mFas и FasTMDel обнаруживалась только на четвертой стадии неопластического процесса. Спектр мРНК, кодирующих минорные формы растворимого Fas белка, широко варьировал на разных стадиях рака молочной железы (табл. 1).

Таким образом, клетки опухолевого очага характеризуются более вариабельной картиной экспрессии мРНК минорных форм Fas белка по сравнению с клетками периферической крови. В клетках опухоли на каждой стадии неопластического процесса наблюдается изменение числа и состава мРНК минорных форм CD95 протеина, в клетках периферической крови такие изменения происходят только при переходе с первой на вторую стадию онкологического процесса.

Встречаемость альтернативных форм мРНК Fas белка в клетках опухолевого очага на разных стадиях рака молочной железы

Формы мРНК CD95 протеина	Стадии рака молочной железы			
	I	II	III	IV
mFas	---	---	---	+
FasTMDel	---	---	---	+
FasExo3,4Del	+	+	+	+
FasExo4Del	---	+	---	+
FasExo3,4,6Del	---	---	+	---
FasExo4,6Del	+	+	---	+

В мононуклеарных клетках периферической крови лиц, получивших ожоговую травму, обнаруживался иной набор мРНК, кодирующий разные формы Fas белка (рис. 5).

В 44% исследованных образцов мононуклеарных клеток периферической крови, вне зависимости от срока с момента получения ожога, детектировались мРНК мембранной и доминирующей растворимой форм, а также единственная минорная форма мРНК, образующаяся в результате делеции 3,4,6 экзонов. Во всех остальных случаях наряду с экспрессией мРНК mFas и FasTMDel были обнаружены три минорные формы мРНК с делециями 4; 4,6 и 3,4,6 экзонов. Заметим, что три указанные минорные формы мРНК Fas белка наблюдались в клетках периферической крови 16 из 19 пострадавших с неблагоприятным исходом ожоговой болезни.

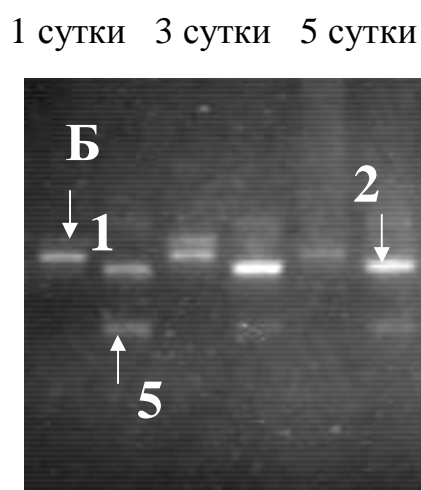
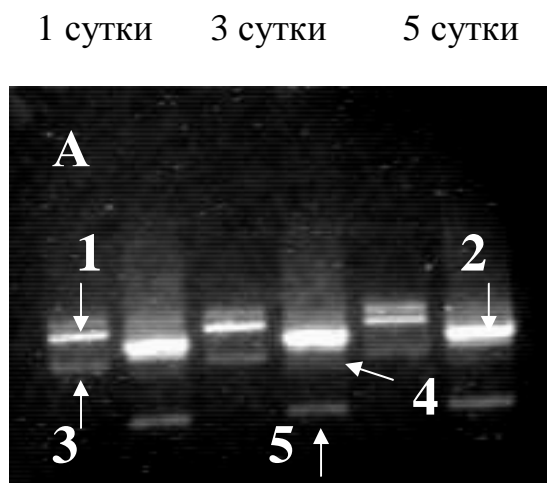


Рис. 5. Электрофореграмма альтернативных форм мРНК Fas белка мононуклеарных клеток периферической крови при ожогах. 1 – mFas; 2 – FasTMDel; 3 – FasExo4Del; 4 – FasExo4,6Del; 5 – FasExo3,4,6Del. А – пять альтернативных форм мРНК Fas белка; Б – три альтернативные формы мРНК Fas белка

Выявленный спектр альтернативных вариантов мРНК Fas белка в клетках периферической крови, печени и опухолевого очага, с одной стороны, отражает особенности транскриптома разных типов клеток, с другой стороны, может оказывать влияние на процессы, связанные с инициацией апоптоза во время развития патологического процесса. По сравнению со здоровыми лицами снижение числа альтернативных форм мРНК CD95 протеина может быть

результатом ингибирования транскрипции гена или усиления деградации мРНК. Не исключено, что оба механизма вовлечены в этот процесс.

Определение уровня экспрессии мРНК мембранной и доминирующей растворимой форм Fas белка показало, что при хроническом гепатите С в клетках крови уровень экспрессии мРНК mFas и FasTMDel был достоверно выше, чем у здоровых лиц. При хроническом гепатите В таких различий выявлено не было (табл. 2).

Таблица 2

Значения порогового цикла амплификации мРНК mFas и FasTMDel мононуклеарных клеток крови при вирусных гепатитах

Группы	Значения порогового цикла амплификации	
	mFas	FasTMDel
Доноры	21,09±0,03	22,07±0,17
ХГС	20,11±0,05*	20,32±0,17*,**
ХГВ	21,07±0,04	21,67±0,18**

\* - статистически достоверные различия по сравнению с донорами ( $p < 0,05$ )

\*\* - статистически достоверные различия между ХГС и ХГВ ( $p < 0,05$ )

При хроническом гепатите С в клетках крови наблюдалось статистически достоверное снижение соотношения уровня экспрессии мРНК мембранной и доминирующей растворимой форм (РЗЦА) по сравнению с донорами. При хроническом гепатите В такая закономерность выявлена не была. Проведенный анализ не выявил статистически достоверных различий в РЗЦА мРНК доминирующей растворимой и мембранной форм CD95 протеина как в клетках печени, так и в мононуклеарных клетках крови при вирусных гепатитах В и С в сравнении друг с другом (табл. 3).

Разница значимых циклов амплификации мРНК FasTMDel и mFas  
мононуклеарных клеток крови при вирусных гепатитах В и С

Группы	Материал исследования	
	гепатоциты	кровь
Доноры	---	0,98±0,14
ХГС	0,15±0,09	0,21±0,12*
ХГВ	0,41±0,12	0,62±0,14

\* - статистически достоверные различия по сравнению с донорами ( $p < 0,05$ )

Согласно данным литературы источником растворимой формы CD95 протеина при вирусных гепатитах могут быть два основных вида клеток: активированные Т-лимфоциты и гепатоциты (Krams et al., 1998). Ранее Птицыной с соавт., (2000) было показано, что при вирусных гепатитах В и С происходит повышение сывороточной концентрации суммарного растворимого CD95 протеина. В отличие от уровня суммарного sCD95 сывороточное содержание олигомерного sCD95 при вирусных гепатитах В и С не претерпевало достоверных изменений. То есть, повышение суммарной фракции Fas белка происходит за счет мономерной формы, ингибирующей апоптоз, в том числе и программу клеточной гибели инфицированных гепатоцитов.

Проведенный анализ спектра форм мРНК Fas белка и уровня экспрессии мРНК FasTMDel в сравнении с его содержанием в сыворотке крови позволяет предположить, что повышение сывороточного содержания суммарного растворимого Fas белка при хронических гепатитах В и С может быть связано с исчезновением в мононуклеарных клетках крови мРНК FasExo3,4Del формы и наличием только одной минорной формы мРНК (FasExo4Del) в клетках печени.

Дополнительно, в мононуклеарных клетках крови при хроническом гепатите С наблюдается повышение уровня экспрессии мРНК FasTMDel. Мы полагаем, что инфицирование вирусом гепатита С приводило к повышению синтеза мРНК растворимой формы CD95 протеина, ростом его концентрации в крови и блокадой апоптотических процессов. Отсутствие достоверных различий от нормы в уровне олигомерного растворимого Fas белка при вирусных гепатитах указывает на независимость экспрессии мРНК FasTMDel и содержания олигомерного sCD95 в сыворотке крови.

При тяжелой ожоговой травме статистически достоверных различий между РЗЦА в группе доноров и группе пострадавших выявить не удалось. При этом у лиц с неблагоприятным исходом ожоговой болезни, наблюдалось изменение соотношения уровней экспрессии мРНК мембранной и доминирующей растворимой форм Fas белка. Это выражалось в снижении средних значений РЗЦА (табл. 4).

Таблица 4

Различия в уровнях экспрессии мРНК FasTMDel и mFas в мононуклеарных клетках периферической крови при ожоговой травме

Прогноз ожоговой болезни	Сроки после травмы (сутки)			Здоровые доноры
	1	3	5	
благоприятный	1,04±0,12	1,11±0,16	0,83±0,28	0,98±0,14
неблагоприятный	0,36±0,21*,**	0,18±0,28*,**	1,12±0,15	

\* - статистически достоверные различия по сравнению с донорами (p<0,05)

\*\* - статистически достоверные различия между группами лиц с благоприятным и неблагоприятным исходами ожоговой болезни (p<0,05)



При раке молочной железы мононуклеарные клетки крови экспрессировали одну или две минорные формы мРНК CD95 протеина наряду с экспрессией мРНК mFas и FasTMDel. В обоих случаях относительное и абсолютное содержание Fas-положительных клеток находилось в пределах нормы (табл. 5). При этом экспрессия мРНК минорной FasExo4,6Del формы наряду с экспрессией мРНК mFas и FasTMDel форм, сопровождалась тенденцией к повышению сывороточного уровня олигомерной формы растворимого CD95 протеина от первой до четвертой стадии неопластического процесса. Экспрессия двух минорных форм мРНК (FasExo4Del и FasExo4,6Del), наряду с экспрессией мРНК mFas и FasTMDel форм, происходила на фоне статистически достоверного понижения сывороточного уровня олигомерного растворимого CD95 протеина на третьей и четвертой стадии рака молочной железы. Снижение сывороточного содержания олигомерного sFas сопровождалось увеличением числа минорных форм мРНК CD95 протеина в клетках опухолевого очага на первой и второй стадии неопластического процесса, появлением мРНК FasExo3,4,6Del формы на третьей стадии и максимальным количеством альтернативных форм мРНК исследуемой молекулы на четвертой стадии рака молочной железы. Следует отметить, что изменение спектра мРНК минорных форм CD95 протеина в мононуклеарных клетках крови и клетках опухолевого очага не сопровождалось изменением сывороточного уровня sCD95 на разных стадиях заболевания. Подобный факт указывает на независимость данных событий.

Можно предположить, что при раке молочной железы продукты трансляции минорных альтернативных форм мРНК Fas белка участвуют в реализации молекулярных механизмов, блокирующих процесс олигомеризации доминирующей растворимой формы исследуемой молекулы. В пользу подобного предположения свидетельствуют полученные нами результаты об увеличении сывороточного содержания суммарной и снижении олигомерной фракций растворимого CD95 протеина.

Сывороточный уровень растворимого Fas белка и относительное содержание CD95-положительных клеток при разных спектрах минорных форм мРНК Fas в клетках крови лиц с диагнозом рак молочной железы

Показатель	Здоровые доноры	Минорные формы мРНК CD95	Стадии неопластического процесса			
			I	II	III	IV
Относительное число CD95 <sup>+</sup> клеток, %	14,2±1,6	FasExo4,6Del	9,8±2,7	10,2±2,9	9,4±1,8	11,6±1,7
		FasExo4,6Del + FasExo4Del	15,7±2,4	16,3±2,7	14,9±3,8	15,4±4,1
Абсолютное число CD95 <sup>+</sup> клеток x 10 <sup>9</sup> /л	0,53±0,01	FasExo4,6Del	0,46±0,03	0,52±0,07	0,57±0,05	0,48±0,04
		FasExo4,6Del + FasExo4Del	0,49±0,05	0,54±0,06	0,52±0,03	0,55±0,06
Суммарный sCD95, U/ml	401,3±38,6	FasExo4,6Del	1121,7±40,3*	1155,4±40,6*	1257,4±50,7*	1213,5±44,1*
		FasExo4,6Del + FasExo4Del	1103,3±50,1*	1208,1±48,7*	1252,45±46,5*	1182,7±48,4*
Олигомерный sCD95, U/ml	250,4±5,7	FasExo4,6Del	261,0±5,9	267,4±6,2	277,3±7,4	282,2±9,3
		FasExo4,6Del + FasExo4Del	248,2±7,6	244,3±7,1	132,2±8,4*,**	121,3±9,7*,**

\* - статистически достоверные различия по сравнению с донорами (p<0,05)

\*\* - статистически достоверные различия между группами (p<0,05)

Тяжелая ожоговая травма пациентов, в мононуклеарных клетках крови которых обнаруживалась мРНК FasExo3,4,6Del, мРНК mFas и FasTMDel, приводила к достоверному снижению относительного числа CD95-положительных клеток по сравнению с донорами (табл. 6). Наличие трех минорных форм (FasExo4Del; FasExo4,6Del и FasExo3,4,6Del) наряду с экспрессией мРНК mFas и FasTMDel форм сопровождалось тенденцией к уменьшению относительного содержания CD95-положительных клеток. Абсолютное содержание CD95-положительных клеток достоверно не различалось у больных, мононуклеарные клетки крови которых экспрессировали одну или три минорные формы мРНК Fas белка, но было статистически достоверно ниже нормы. У пострадавших, мононуклеарные клетки которых экспрессировали одну минорную форму мРНК (FasExo3,4,6Del), мРНК mFas и FasTMDel, сывороточный уровень олигомерной фракции растворимого Fas белка был статистически достоверно снижен в 1,7 раза по сравнению с донорами уже в первые сутки с момента получения травмы и оставался пониженным на третьи и пятые сутки. Наличие трех минорных форм мРНК растворимого Fas белка (FasExo4Del; FasExo4,6Del и FasExo3,4,6Del) и мРНК mFas и FasTMDel не приводило к изменению сывороточного содержания олигомерной фракции исследуемой молекулы. Сохранение уровня олигомерного sFas белка в пределах нормы может рассматриваться как свидетельство отсутствия патофизиологических изменений на стадии инициации апоптоза и, как следствие, неучастия этого протеина в реализации запрограммированной гибели клеток.

У пострадавших от ожоговой травмы, мононуклеарные клетки крови которых экспрессировали мРНК либо одной, либо трех минорных форм наряду с экспрессией мРНК мембранной и доминирующей растворимой форм, не наблюдалось достоверных различий в сывороточном содержании суммарной фракции растворимого CD95 протеина как по сравнению с донорами, так и в сравнении друг с другом.

Сывороточный уровень растворимого Fas белка и относительное содержание CD95-положительных клеток при разных спектрах минорных форм мРНК Fas в клетках крови пострадавших от ожоговой травмы

Показатель	Здоровые доноры	Минорные формы мРНК CD95	Сроки после травмы (сутки)		
			первые	третьи	пятые
Относительное число CD95 <sup>+</sup> клеток, %	14,2±1,6	FasExo3,4,6Del	4,8±1,7*	5,0±1,8*	5,6±1,7*
		FasExo4Del+ FasExo4,6Del+ FasExo3,4,6Del	7,2±2,4	9,2±2,7	10,4±1,9
Абсолютное число CD95 <sup>+</sup> клеток x 10 <sup>9</sup> /л	0,53±0,01	FasExo3,4,6Del	0,04±0,02*	0,12±0,05*	0,15±0,04*
		FasExo4Del+ FasExo4,6Del+ FasExo3,4,6Del	0,05±0,02*	0,15±0,03*	0,18±0,06*
Суммарный sCD95, U/ml	401,3±38,6	FasExo3,4,6Del	378,7±12,3	371,4±18,7	383,5±20,1
		FasExo4Del+ FasExo4,6Del+ FasExo3,4,6Del	398,3±10,1	400,5±17,3	351,3±20,4
Олигомерный sCD95, U/ml	250,4±5,7	FasExo3,4,6Del	136,0±6,8*,**	143,3±7,4*,**	154,2±12,1*,**
		FasExo4Del+ FasExo4,6Del+ FasExo3,4,6Del	224,4±7,6	258,7±8,1	273,2±9,7

\* - статистически достоверные различия по сравнению с донорами (p<0,05)

\*\* - статистически достоверные различия между группами (p<0,05)

Можно предположить, что при тяжелой ожоговой травме повышение чувствительности мононуклеарных клеток к апоптозу наблюдается уже на уровне экспрессии соответствующих мРНК. Это выражается в уменьшении в сравнении с нормой количества минорных альтернативных форм мРНК Fas белка, изменении соотношения уровня экспрессии мРНК mFas и FasTMDel, понижении сывороточного уровня суммарного sCD95, а также в достоверном снижении относительного числа CD95-положительных клеток крови.

Таким образом, для вирусных гепатитов В и С, рака молочной железы и ожоговой травмы общей чертой регуляции Fas-зависимого апоптоза является уменьшение числа минорных альтернативных форм мРНК Fas белка в мононуклеарных клетках крови при наличии мРНК мембранной и доминирующей растворимой форм.

## **ВЫВОДЫ**

1. Обнаружено, что в мононуклеарных клетках периферической крови у лиц, инфицированных вирусами гепатитов В и С, у больных раком молочной железы и при ожогах наблюдается уменьшение числа мРНК минорных альтернативных форм CD95 протеина по сравнению со здоровыми донорами. Данный факт сопровождается изменением динамического равновесия в содержании мономерной и олигомерной форм растворимого Fas белка.
2. Выявлено достоверное повышение уровня экспрессии мРНК mFas и FasTMDel, достоверное снижение соотношения уровня экспрессии мРНК доминирующей растворимой формы к уровню экспрессии мРНК мембранной формы в клетках крови лиц с хроническим гепатитом С по сравнению с донорами.
3. Установлено, что при тяжелой ожоговой травме достоверное снижение соотношения уровня экспрессии мРНК FasTMDel к уровню экспрессии мРНК mFas в мононуклеарных клетках крови наблюдалось у лиц с неблагоприятным исходом ожоговой болезни.

4. Показано, что в мононуклеарных клетках крови экспрессия мРНК FasExo3,4,6Del формы при ожоговой травме, а также экспрессия мРНК FasExo4,6Del и FasExo4Del форм при неопластическом процессе сопровождалась достоверным снижением сывороточного уровня олигомерного sCD95 по сравнению с нормой.
5. Обнаружено, что при хроническом гепатите С отсутствие в клетках крови мРНК FasExo3,4Del формы наряду с детекцией в клетках печени мРНК FasExo4Del формы и повышением уровня экспрессии мРНК FasTMDel сопровождалось увеличением сывороточного содержания суммарного sCD95 по сравнению с донорами.
6. Выявлено, что при хроническом гепатите С и раке молочной железы изменения в спектре и количественном содержании мРНК Fas белка в мононуклеарных клетках периферической крови не сопровождалось изменениями относительного числа CD95-положительных клеток.
7. Установлено, что при ожогах у лиц, в клетках крови которых присутствует мРНК FasExo3,4,6Del формы, наблюдалось достоверное по сравнению с донорами снижение относительного числа CD95-положительных клеток на первые, третьи и пятые сутки с момента получения травмы.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **I. Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:**

1. Евсегнеева И.В. Содержание суммарной и олигомерной фракций CD95 антигена в сыворотке крови больных вирусными гепатитами В и С / Евсегнеева И.В., Птицына Ю.С., Новиков Д.В., Отмахова И.А., **Уткин О.В.**, Кравченко Г.А., Барышников А.Ю., Новиков В.В. // Физиология и патология иммунной системы. – 2005. – Т. 9, № 3. – С. 12-15.
2. Новиков В.В. Растворимые антигены CD38 и CD95 при раке молочной железы / Новиков В.В., Алясова А.В., **Уткин О.В.**, Лютина Е.В., Новиков

- Д.В., Варшавская Л.В. // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – №3. – С. 46-51.
3. Кравченко Г.А. Изучение сывороточного уровня Fas протеина при вирусном гепатите В у наркоманов. / Кравченко Г.А., **Уткин О.В.**, Новиков В.В., Птицына Ю.С. // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, серия Инновация в образовании. – 2005. – Выпуск 1(9). – С. 257-261.
  4. **Уткин О.В.** Содержание суммарной и олигомерной фракций растворимого CD95 в сыворотке крови ожоговых больных / Уткин О.В., Новиков В.В., Лебедев М.Ю. // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, серия Биология. – 2006. – Выпуск 1(11). – С. 146-149.

**II. Статьи, доклады, тезисы докладов региональных и всероссийских конференций:**

1. Novikov D.V. Real time PCR for comparative analysis of the mRNA expression of membrane and dominant soluble forms Fas-antigen / Novikov D.V., Lebedev M.Ju., **Utkin O.V.**, Zimin Ju.V., Lutina E.V., Sergeeva T.F., Novikov V.V. // Third Moscow international congress: Biotechnology, Moscow, March, 14-18, 2005. – P. 195-195.
2. **Уткин О.В.** Изучение Fas-зависимого апоптоза мононуклеарных клеток периферической крови на модели ожоговой травмы / Уткин О.В., Лебедев М.Ю., Новиков Д.В. // Российская научно-практическая конференция: Узловые вопросы борьбы с инфекцией, Санкт-Петербург, 1-2 декабря 2004 года. – С. 249-250.
3. Лебедев М.Ю. Изучение экспрессии мРНК Fas-антигена при различных патологиях / Лебедев М.Ю., **Уткин О.В.**, Новиков В.В., Новиков Д.В., Зимин Ю.В. // Паллиативная медицина и реабилитация. – 2005. – № 1. – С. 74-74.
4. **Уткин О.В.** Сравнительный анализ экспрессии мРНК мембранной и доминирующей форм Fas-антигена, с использованием ПЦР в реальном времени / Уткин О.В., Новиков Д.В., Лебедев М.Ю., Новиков В.В. //

- Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых, Пушкино. – 2005. – С. 212-212.
5. Ряскова Е.А. Экспрессия матричных РНК различных форм Fas-антигена в лимфоцитах периферической крови тяжелообожженных / Ряскова Е.А., **Уткин О.В.**, Сергеева Т.Ф., Лебедев М.Ю. // Сборник научных трудов I съезда комбустиологов России, Москва. – 2005. – С. 85-86.
  6. **Уткин О.В.** Изучение экспрессии альтернативных форм мРНК Fas-антигена при вирусных гепатитах и ожоговой травме / Уткин О.В., Лебедев М.Ю., Новиков Д.В., Новиков В.В. // Материалы научной конференции, посвященной 85-летию со дня рождения ак. РАМН И.Н. Блохиной, Н. Новгород. – 2006. – С. 202-206.
  7. **Уткин О.В.** Изучение экспрессии альтернативных форм мРНК Fas-антигена при различных патологиях / Уткин О.В., Новиков Д.В. // XI Нижегородская сессия молодых ученых естественнонаучные дисциплины. – 2006. – С. 205-206.
  8. **Уткин О.В.** Экспрессия матричной РНК Fas-антигена при раке молочной железы и раке легкого / Уткин О.В., Новиков Д.В., Степанова Л.С., Иванчикова К.М., Новиков В.В. // X Росс. онкол. конгресс. – М. – 2006. – С. 240-240.