

© Д.С.Кутилин, С.Н.Димитриади, Д.И.Водолажский, Е.М.Франциянц, О.И.Кит, 2017  
УДК 616.61-006.6-005.4 : 612.014 : 577.7

*Д.С. Кутилин<sup>1</sup>, С.Н. Димитриади<sup>2</sup>, Д.И. Водолажский<sup>1</sup>, Е.М. Франциянц<sup>3</sup>,  
О.И. Кит<sup>4</sup>*

## ВЛИЯНИЕ ТЕПЛОВОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ НА ЭКСПРЕССИЮ АПОПТОЗ-РЕГУЛИРУЮЩИХ ГЕНОВ В ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ БОЛЬНЫХ С ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ

<sup>1</sup>Лаборатория молекулярной онкологии, <sup>2</sup>отделение онкоурологии, <sup>3</sup>лаборатория изучения патогенеза злокачественных опухолей,  
<sup>4</sup>Администрация Ростовского научно-исследовательского онкологического института, Россия

*D.S. Kutilin<sup>1</sup>, S.N. Dimitriadi<sup>2</sup>, D.I. Vodolazhsky<sup>1</sup>, E.M. Frantsiyants<sup>3</sup>, O.I. Kit<sup>4</sup>*

## EFFECT OF THERMAL ISCHEMIA-REPERFUSION ON EXPRESSION OF APOPTOSIS-REGULATING GENES IN THE RENAL TISSUE OF PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Oncology, <sup>2</sup>Department oncurology, <sup>3</sup>Laboratory studies of malignant tumors pathogenesis, <sup>4</sup>Administration Rostov  
Cancer Research Institute, Russia

### РЕФЕРАТ

Расширение представлений о молекулярных механизмах повреждающего действия тепловой ишемии с реперфузией на почечную ткань больных раком почки имеет значительные перспективы для новых терапевтических подходов, направленных на повышение качества лечения. **ЦЕЛЬ:** изучение изменения экспрессии апоптоз-регулирующих генов MDM 2, BAX, CASP7, CASP3, CASP8, CASP9, BCL2, CASP8/FADD, p53, APAF1, AIFM1, ICAD и XIAP в почечной ткани больных с почечно-клеточным раком, подвергнутой действию ишемии и реперфузии. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Для исследования использовали биоптаты тканей 12 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом рак почки. Пункционную биопсию проводили до остановки кровоснабжения, на 10-й минуте ишемии и через 20 мин после восстановления кровотока в почке. Относительную экспрессию генетических локусов определяли методом ПЦР в реальном времени. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Обнаружено: 1) отсутствие на 10-й минуте ишемии достоверных отличий транскриптомного профиля большинства исследованных нами генов от аналогичных показателей до проведения ишемии, за исключением снижения экспрессии гена CASP7 и ICAD; 2) достоверное увеличение экспрессии как про-апоптозных генов (BAX, CASP3 и 7, p53 и APAF1), так и антиапоптозных генов (XIAP, MDM2 и BCL2) через 20 мин после восстановления кровотока в тканях почки; 3) изменение в балансе экспрессии пар про- и антиапоптозных генов p53/MDM2 и Bax/BCL2 на 10-й минуте ишемии и через 20 мин после восстановления кровотока. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Полученные данные характеризуют транскриптомное состояние почечной ткани в ранний период после ишемии и восстановления в ней кровотока как инициаторную точку сдвига баланса про- и антиапоптозных генов.

**Ключевые слова:** рак почки, ишемия, реперфузия, экспрессия генов, апоптоз.

### ABSTRACT

Improved knowledge of molecular mechanisms of the damaging effect of thermal ischemia and reperfusion to renal tissue of patients with renal cancer has significant prospects for new therapeutic approaches aimed at enhancing quality of care. **THE AIM:** to study changes in the expression of apoptosis-regulating genes MDM 2, BAX, CASP7, CASP3, CASP8, CASP9, BCL2, CASP8 / FADD, p53, APAF1, AIFM1, ICAD and XIAP in renal tissue of patients with renal cell carcinoma subjected to the action of ischemia and reperfusion. **PATIENTS AND METHODS.** We used for the study tissue biopsies of 12 patients with histologically confirmed diagnosis of renal cancer. Needle biopsy was performed before stop the blood supply, for 10 minutes of ischemia and 20 minutes after reperfusion in the kidney. The relative expression of genetic loci was determined by real-time PCR. **RESULTS.** It was found: 1) absence from the 10th minute of ischemia significant differences transcriptome profile of the majority of investigated genes from similar parameters prior to ischemia, with the exception of reducing expression of genes CASP7 and ICAD; 2) a significant increase in expression of pro-apoptotic genes (BAX, CASP3/7, APAF1 and p53), and anti-apoptotic genes (XIAP, MDM2 and BCL2) 20 minutes after reperfusion of the kidney tissue; 3) a changes in the balance of expression of pairs of pro- and anti-apoptotic genes p53 / MDM2 and Bax / BCL2 in the 10th minute of ischemia and 20 minutes after reperfusion. **CONCLUSION.** These data characterize transcriptomic state of renal tissue in the early period after ischemia and restore the blood flow in it as the initiation point shift the balance of pro- and anti-apoptotic genes.

**Key words:** renal cancer, ischemia, reperfusion, the expression of genes, apoptosis.

Кутилин Д.С. 344037, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63.  
Ростовский научно-исследовательский онкологический институт. Тел.:  
+7-951-538-50-39, e-mail: k.denees@yandex.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Органосохраняющие операции при раке почки, в частности, выполнение резекции опухолей сложных локализаций, требуют применения продолжительной тепловой ишемии с последующей реперфузией [1]. Ишемия/реперфузия является основной причиной развития острого повреждения почек (ОПП) [2]. Общее клиническое состояние данного подхода по-прежнему ассоциируется с высоким уровнем заболеваемости и смертности, несмотря на значительные успехи в поддерживающей терапии [3]. Важные открытия были сделаны в определении биологических последствий ишемического повреждения почек. Морфологический ответ клеток почечных канальцев зависит от интенсивности и тяжести ишемии и включает в себя потерю клеточной полярности, апоптоз, дедифференцировку жизнеспособных клеток, пролиферацию, дифференцировку и реституцию нормального эпителия [4]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе каждого из этих явлений, интенсивно изучаются и имеют значительные перспективы для новых терапевтических подходов, направленных на повышение качества лечения и/или ускорения процесса восстановления.

В качестве возможного механизма, приводящего к гибели клеток почечных канальцев и эпителия после ишемического воздействия на почки, рассматривается апоптоз [5]. Апоптоз, характеризующийся сморщиванием клеток, конденсацией и фрагментацией ядер и межнуклеосомной деградацией ДНК, был зарегистрирован в культивируемых клетках почечных канальцев в образцах биоптатов человека, полученных из почек трупов [6]. Поэтому в настоящее время интерес исследователей направлен на идентификацию внутриклеточных путей, участвующих в рецепции стимулов, передаче сигналов и реализации фаз апоптоза клетками трубчатого эпителия почек в результате воздействия ишемии/реперфузии.

По данным ряда авторов, даже при использовании тепловой ишемии стандартной продолжительности (до 20 мин включительно) в раннем послеоперационном периоде возникают осложнения в виде развития острого повреждения почек (ОПП) в 20–30% случаев [6–9]. Ишемия тканей сопровождается повреждением субклеточных структур, в том числе митохондрий, что приводит к активации факторов апоптоза и инициации каспаз-зависимого апоптозного каскада, в результате которого клетки «совершают самоубийство» [10].

До настоящего времени влияние тепловой ишемии и последующей реперфузии на транскрипци-

онный профиль апоптоз-регулирующих генов в почечной ткани пациентов, больных раком, описано недостаточно [11]. Поэтому целью нашего исследования стало изучение изменения экспрессии апоптоз-регулирующих генов *MDM 2*, *BAX*, *CASP7*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BCL2*, *CASP8/FADD (CFLAR)*, *p53*, *APAF1*, *AIFM1*, *ICAD*, *XIAP* в почечной ткани больных с почечно-клеточным раком для расширения представлений о фундаментальных молекулярных механизмах повреждающего действия ишемии и реперфузии.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Для исследования использовали биоптаты тканей 12 пациентов популяции Юга России с гистологически подтвержденным диагнозом рак почки, поступивших на лечение в ФГБУ РНИОИ МЗ РФ в 2014–2015 гг. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ РНИОИ; в каждом конкретном случае было получено информированное согласие больного на включение его в данное исследование, в том числе, на биопсию почки.

Продолжительность тепловой ишемии почки в процессе проведения операции не превышала 20 мин. Во время проведения лапароскопической резекции почки с использованием тепловой ишемии, до остановки кровоснабжения в резецируемой почке с помощью пистолета Pro Mag Ultra иглой 16 G выполняли пункционную биопсию среднего сегмента резецируемой почки, забирая столбик ткани интактной паренхимы. Пункционную биопсию повторяли на 10-й минуте ишемии и через 20 мин после восстановления кровотока в почке. Гемостаз осуществляли при помощи электрокоагуляции, в случае необходимости накладывался гемостатический шов. Образцы для транспортировки в лабораторию и хранения мгновенно замораживали в жидком азоте без использования крио-/транспортных РНК-сред. Максимальное время от взятия образца до его заморозки в жидком азоте составляло не более 20 с.

Фрагменты ткани измельчали и растирали в фарфоровых ступках в лизирующем растворе, содержащем 4 М гуанидин тиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,5% саркозил и 0,1 М 2-меркаптоэтанол. Дальнейшее выделение РНК из тканей проводили по методу P. Chomczynski и N. Sacchi [12]. Полученные образцы суммарной РНК обрабатывали препаратами ДНК-азы. Синтез кДНК проводили с использованием коммерческих наборов «Reverta-L» («Интерлабсервис», Россия).

Методом RT-qPCR определяли величины относительной экспрессии 13 генетических локу-

сов: *MDM2*, *BAX*, *CASP7*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BCL2*, *CASP8/FADD (CFLAR)*, *p53*, *APAF1*, *AIFM1*, *ICAD*, *XIAP*. В качестве референсного использовали ген *ACTB*. Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров (таблица) осуществлялся нами с использованием референсных последовательностей NCBI GenBank и программы Primer-BLAST на основе следующих принципов: область отжига олигонуклеотидных праймеров должна быть в диапазоне 58–63 °C; GC-состав в диапазоне 40–60%; в последовательности праймера должны отсутствовать стабильные вторичные структуры – шпильки и димеры, e-value последовательности праймера должно стремиться к нулю и быть не больше 0,05, а query coverage (покрытие целевой последовательности) 100% (для версии BLASTN 2.3.1+), температуры отжига праймеров (forward и reverse) не должны различаться друг от друга более чем на 0,5°. При подборе праймеров учитывался сплайсинг мРНК (использовали опцию «Primer must span an exon-exon junction» программы Primer-BLAST): так для гена *ACTB* прямой праймер покрывает соответствующую последовательность в конце 3-го экзона, а обратный праймер – последовательность в начале 4-го экзона.

Анализируемые последовательности гене-

тических локусов амплифицировали в 25 мкл ПЦР-смеси, содержащей 12 нг кДНК, 0,25мМ dNTPs, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1х-ый ПЦР-буфер и 1 ед. акт. SynTaq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами («Синтол», Россия), краситель EVA-Green и по 400 нМ прямого и обратного праймеров для референсного гена (β-актина, *ACTB*) или гена-мишени. Количественную ПЦР-ПВ-амплификацию проводили на термоциклере «Bio-Rad CFX96» («Bio-Rad», USA) по следующей программе: первичная денатурация: t=95 °C в течение 3 мин 40 циклов: t=95 °C в течение 10 с, t=58 °C в течение 30 с, t=72 °C в течение 30 с. Относительную экспрессию генетического локуса (RE) рассчитывали по формуле  $RE = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  [13, 14]. Нормализацию проводили по референсному гену *ACTB* и экспрессии генов в образцах пункционной биопсии, отобранных у этих же пациентов до остановки кровоснабжения, последовательно по схеме, приведенной ниже:

1. Нормализация по референсному гену:  $DC(t) = C(t)_{target} - C(t)_{ACTB}$ .

2. Расчёт медианы DC(t) по каждому гену контрольной (образцы пункционной биопсии до остановки кровоснабжения) и опытной (через 10 мин после ишемии и 20 мин после реперфузии) групп.

Таблица

#### Характеристика используемых в исследовании праймеров

Наименование праймеров	№ NCBI GenBank	Последовательность	T отжига, °C
<i>ACTB (reference)</i>	NM_001101.3	Прямой: AAC CGC GAG AAG ATG ACC C Обратный: AGC ACA GCC TGG ATA GCA AC	60 60
<i>MDM2</i>	NM_001145339.2	Прямой: TAG GAG ATT TGT TTG GCG TGC Обратный: CCT GCT GAT TGA CTA CTA CCA A	60 60
<i>BAX</i>	NM_001291428.1	Прямой: GGG ACG AAC TGG ACA GTA ACA Обратный: GCT GCC ACT CGG AAA AAG AC	61 60
<i>BCL2</i>	NM_000633.2	Прямой: GGA TCC AGG ATA ACG GAG GC Обратный: GAA ATC AAA CAG AGG CCG CA	63 58
<i>p53</i>	NM_000546.5	Прямой: TTG GAA CTC AAG GAT GCC CA Обратный: CGG GAG GTA GAC TGA CCC T	58 62
<i>CASP3</i>	NM_004346.3	Прямой: CTG GAA TAT CCC TGG ACA ACA GT Обратный: TCG ACA TCT GTA CCA GAC CGA	63 61
<i>CASP8</i>	NM_001228.4	Прямой: CTG AAG CAA ACA GCC AGT GC Обратный: GAC CTC AAT TCT GAT CTG CTC AC	60 63
<i>CASP9</i>	NM_032996.3	Прямой: TGA GAC CCT GGA CGA CAT CT Обратный: TCC CTT TCA CCG AAA CAG CA	60 58
<i>CASP7</i>	NM_033338.5	Прямой: AAG CTG ACT TCC TCT TCG CC Обратный: TCC AGG TCT TTT CCG TGC TC	60 60
<i>CFLAR</i>	NM_003879.5	Прямой: GCC GAG GCA AGA TAA GCA AG Обратный: AAT CCA GTT GAT CTG GGG CAA	60 60
<i>AIFM1</i>	NM_001130847.3	Прямой: TCA GGG ACA AAG TGG TCG TG Обратный: ATC TTC ATG CTG CTC ACC GT	60 58
<i>APAF1</i>	NM_001160.2	Прямой: ACC TCT GCT GAC AAG ACT GC Обратный: GTT GTG GCC CCT CAA TTC AT	60 58
<i>XIAP</i>	NM_001167.3	Прямой: ACT GAG AAA ACA CCA TCA CTA ACT Обратный: TGT CCT TGA AAC TGA ACC CCA	60 60
<i>ICAD</i>	NM_213566.1	Прямой: TCT GTC CAG CAT CAT CCT CC Обратный: GGT GGC ACA ACT CTG ACG TA	60 60

3. Нормализация по контрольной группе:  

$$\text{ДДС}(t) = \text{ДС}(t)_{\text{Медиана опытной группы}} - \text{ДС}(t)_{\text{Медиана контрольной группы}}$$

4. Окончательный результат (кратное различие (Fold difference):  $2^{-\text{ДДС}(t)}$ ).

Статистический анализ результатов выполняли с использованием пакета прикладных статистических программ «Microsoft Excel 2013» («Microsoft Corporation», США) и STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США). Результаты представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка средней. Статистическую значимость различий двух средних определяли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для связанных выборок; частот –  $\chi^2$ -критерия Пирсона. Нулевую статистическую гипотезу об отсутствии различий и связей отвергали при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На 10-й минуте проведения тепловой ишемии транскриптомный профиль исследованных нами генов *MDM2*, *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BCL2*, *CASP8/FADD (CFLAR)*, *p53*, *APAF1*, *AIFM1* и *XIAP* достоверно не отличался от аналогичных показателей экспрессии этих же генетических локусов до

проведения ишемии (контроль), и только экспрессия генов *CASP7* и *ICAD* статистически достоверно ( $p < 0,05$ ) снижалась на 40 и 10% соответственно по отношению к показателям контроля (рис. 1).

Через 20 мин после восстановления кровотока (реперфузии) наблюдалось статистически достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение экспрессии генов в тканях почки по сравнению с состоянием до проведения тепловой ишемии (рис. 2) как проапоптозных генов – *BAX* на 30%, *CASP3* и 7 на 30%, *p53* на 60% и *APAF1* на 50%, так и антиапоптозных генов *XIAP* на 30%, *MDM2* на 30% и *BCL2* на 40%.

Через 20 мин после реперфузии почки относительно состояния на 10-й минуте ишемии наблюдалось статистически достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение экспрессии следующих генов *MDM2*, *CASP7*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BCL2*, *p53*, *APAF1*, *AIFM1*, *ICAD* и *XIAP* на 40, 110, 80, 40, 150, 80, 60, 80, 200, 20% и 50% соответственно (рис. 3).

При оценке соотношения экспрессии пар про- и антиапоптозных генов *p53/MDM2* и *BAX/BCL2* на 10-й минуте ишемии и через 20 мин после восстановления кровотока (рис. 4) обнаружены изменения в балансе экспрессии этих генов. На 10-й минуте тепловой ишемии почки соотноше-

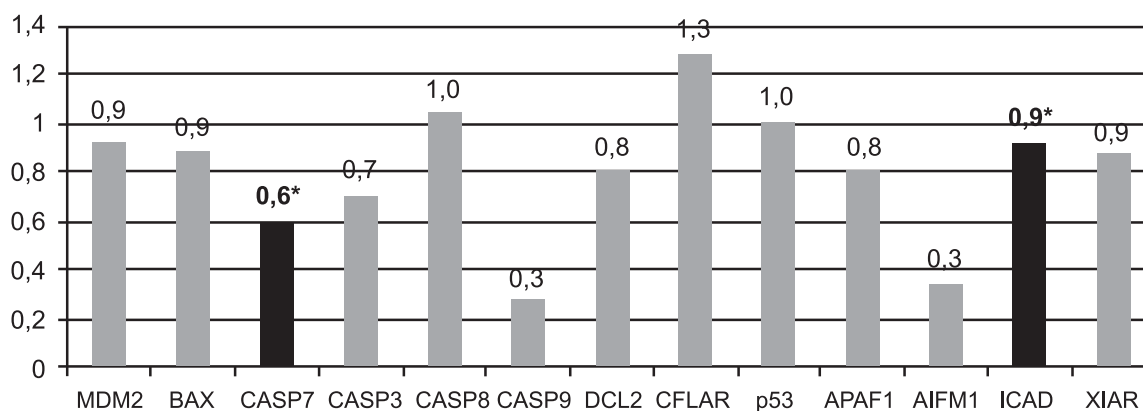


Рис. 1. Изменение экспрессии генов на 10-й минуте ишемии почки относительно состояния до ишемии. \*Отмечены локусы, изменения в которых были статистически достоверны для  $p < 0,05$ .

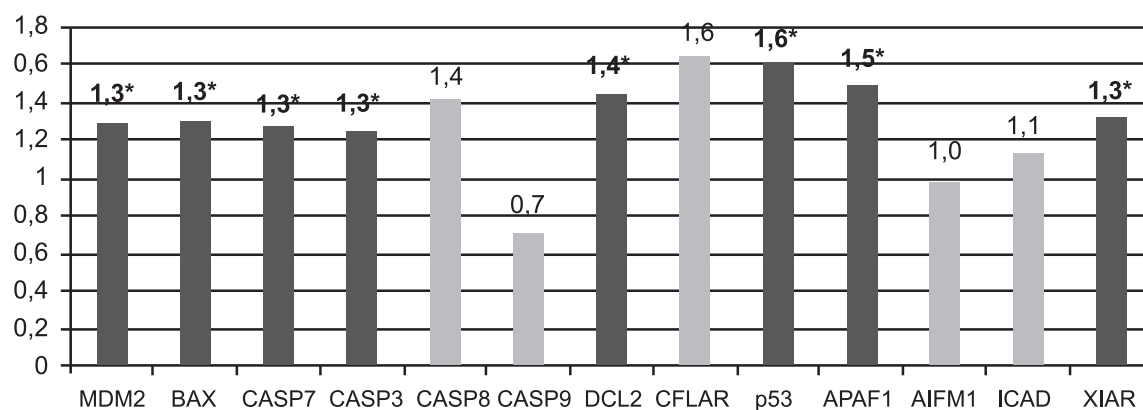


Рис. 2. Изменение относительной экспрессии генов через 20 мин после реперфузии почки относительно состояния до ишемии. \*Отмечены локусы, изменения в которых были статистически достоверны для  $p < 0,05$ .



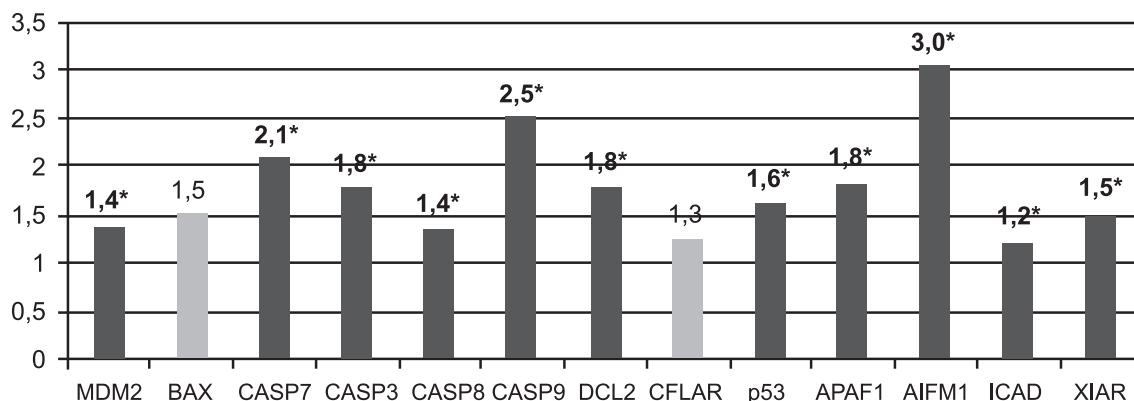


Рис. 3. Изменение относительной экспрессии генов через 20 мин после реперфузии почки относительно состояния на 10 минуте ишемии. \*Отмечены локусы, изменения в которых были статистически достоверны для  $p < 0,05$ .

ние  $p53/MDM2$  на 8% ( $p < 0,05$ ) выше, чем до ишемии, что связано со снижением экспрессии  $MDM2$  в этой временной точке относительно состояния до ишемии на 8%; а соотношение  $BAX/BCL2$  на 10% ( $p < 0,05$ ) выше, чем до ишемии, что связано с изменением экспрессии обоих генов. На стадии реперфузии соотношение  $p53/MDM2$  на 25% ( $p < 0,05$ ) выше, чем до ишемии, что обусловлено более значительным увеличением экспрессии гена  $p53$ , чем  $MDM2$ ; а соотношение экспрессии генов  $BAX/BCL2$  на 10% ( $p < 0,05$ ) ниже, чем до ишемии,

что обусловлено более значительным увеличением экспрессии гена  $BCL2$ , чем гена  $BAX$ .

### ОБСУЖДЕНИЕ

Отсутствие статистически достоверных изменений экспрессии большинства как про-, так и антиапоптозных кластеров генов во время проведения тепловой ишемии почки свидетельствует о том, что прекращение снабжения почки на 10 мин не создает необходимых условий для изменения транскрипционной активности исследованных генов, вовлеченных в регуляцию механизмов внутреннего и/или внешнего рецепторного путей апоптоза. Также нами не исключается возможность того, что для реализации каких-либо изменений необходим более длительный интервал времени (латентный период). Статистически значимое снижение экспрессии в данном временном диапазоне было отмечено для одной из эффекторных каспаз – каспазы-7, что можно охарактеризовать как ингибирование апоптоза, а также для антиапоптозного гена  $ICAD$ , участвующего в предотвращении фрагментации ДНК и конденсации хроматина.

Через 20 мин после восстановления кровотока (реперфузии), по сравнению с состоянием до проведения ишемии, наблюдается множественная активация транскрипции исследованных генетических локусов (см. рис. 2). Статистически значимо через 20 мин после реперфузии почки наблюдалась активация транскрипции генов, продукты которых вовлечены в регуляцию  $p53$ -зависимого пути апоптоза ( $MDM2$  и  $p53$ ), митохондриального пути апоптоза (продукт гена  $BAX$  образует олигомерные поры в митохондриальной мембране, что приводит к высвобождению цитохрома  $C$ , продукт гена  $APAF1$ , связываясь с цитохромом  $C$  и dATP, формирует апоптосому) и эффекторную часть каспазного каскада (гены эффекторной каспазы-3 и -7,  $CASP3$  и 7). Также наблюдалось статистически

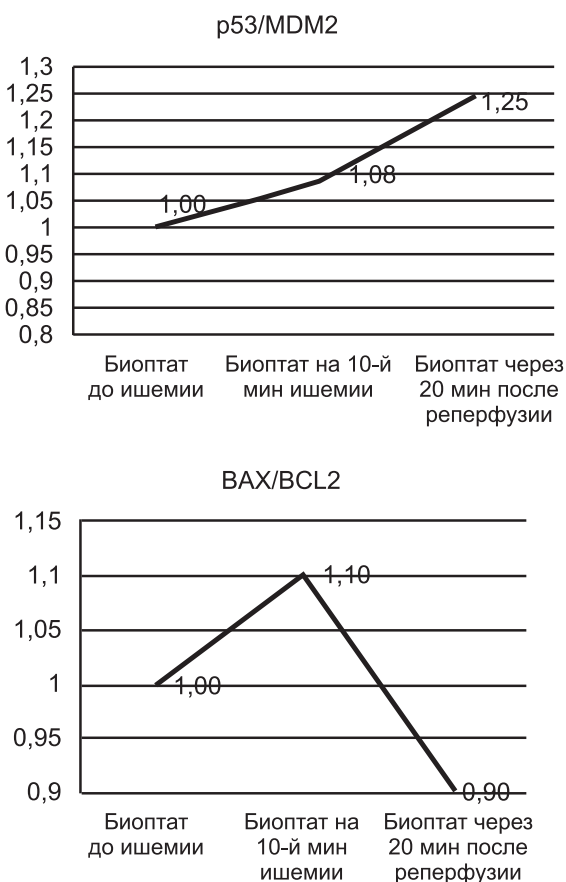


Рис. 4. Соотношение экспрессии пар про-/антиапоптозных генов  $p53/MDM2$  и  $BAX/BCL2$  до ишемии, на 10-й минуте ишемии и через 20 мин после восстановления кровотока в почке.

достоверное увеличение экспрессии на 30% гена *XIAP*, основной функцией которого является ингибирование процесса апоптоза в клетках [15]. *XIAP* связывает и ингибирует каспазы-3, -7 и -9, таким образом, блокируя как внешний (рецепторный), так и внутренний (митохондриальный) пути апоптоза [16].

Пермеабилзация митохондриальной мембраны регулируется белками семейства *BCL2* [17]. Встраивание в мембрану митохондрий белков *BAX* приводит к образованию пороподобных структур, а активация и функционирование *BAX* может блокироваться антиапоптотическим белком *BCL-2* [18]. В нашем эксперименте через 20 мин после реперфузии почки в её тканях обнаружено статистически достоверное увеличение экспрессии гена *BCL2* (превышающее увеличение экспрессии гена *BAX*), результатом чего может быть ингибирование митохондриального пути апоптоза.

*p53* относится к генам-онкосупрессорам, но одной из важных функций продукта этого гена (белка *p53*) является активация белков репарации ДНК при её повреждении [19]. Существенное и статистически достоверное увеличение экспрессии этого белка в почечной ткани на этапе реперфузии может свидетельствовать об усилении процессов образования АФК и повреждении ДНК. С другой стороны – увеличение в почечной ткани пациентов экспрессии гена *p53* может стимулировать экспрессию гена *MDM2* [20]. Продукт гена *MDM2* в свою очередь блокирует действие *p53*, связываясь с ним, убиквитинилирует его для последующей деградации протеасомой. Всё это в совокупности с активацией экспрессии гена *XIAP* и *BCL2*, вероятно, препятствует развитию апоптотических процессов в данном временном интервале.

При сравнении транскриптомных характеристик исследуемых генов на 10-й минуте ишемии и через 20 мин после реперфузии наблюдаются более значительные отличия, чем при сравнении с состоянием до ишемии. Достоверно увеличивается экспрессия всех генов, за исключением *BAX* и *CFLAR*. Следует отметить значительное повышение экспрессии генов *CASP8*, *CASP9* и *AIFM1* (см. рис. 3) и их важную роль в развитии апоптоза. Каспаза-8 – классическая иницирующая каспаза, участвующая в передаче сигнала от рецепторов апоптоза *Fas*, *TNF-R1* и *DR1-5* связывается с белком *FADD* и иницирует протеолитический каскад [21]. Каспаза-9 активирует каспазу-3, которая в свою очередь расщепляет прокаспазу-9, таким образом создается цикл амплификации апоп-

тозного сигнала, при этом активация каспазы-9 сопровождается высвобождением модуля *CARD*, повышающего экспрессию антиапоптотических генов [22]. В результате индукции апоптоза белок *AIFM1* перемещается в ядро, где он вызывает конденсацию и фрагментацию хромосом; кроме того, он индуцирует высвобождение митохондриями апоптогенного фактора цитохрома *C* [23].

При анализе соотношения экспрессии генов *p53/MDM2* и *BAX/BCL2* (см. рис. 4) необходимо учитывать тот факт, что экспрессия генов *MDM2* и *BCL2* значительно превышает экспрессию генов *p53* и *BAX* на 48 и 71% (при сравнении относительно гена *ACTB*) соответственно. Однако обнаруженные изменения соотношений экспрессии отражают состояние баланса про/антиапоптотических систем в клетках почек, подвергнутых ишемии/реперфузии. При этом наибольшее отклонение от состояния до ишемии характерно для системы *p53/MDM2* через 20 мин после реперфузии. Это может объясняться накоплением повреждений в ДНК активными формами кислорода на стадии реперфузии, что вызывает повышение экспрессии гена *p53* для активации репарационных процессов. Соотношение экспрессии генов *BAX/BCL2* относительно состояния до ишемии изменяется менее значительно, наибольшее отличие в балансе *BAX/BCL2* наблюдается между 10-й минутой ишемии и через 20 мин после реперфузии.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках проведенного нами исследования установлено, что ишемия и реперфузия оказывают разноплановый характер воздействия на уровень относительной экспрессии апоптоз-регулирующих генетических локусов. В обоих случаях (ишемия и реперфузия) наблюдается почти синхронное угнетение (при ишемии) или активация (реперфузия) транскрипционной активности про-апоптотических и антиапоптотических генов. Это состояние сохраняющегося паттерна транскрипционной активности при различной модальности её направленности, вероятно, является характерным для состояния почечной ткани в ранний период после ишемии и восстановления в ней кровотока. Вероятность развития апоптоза по «митохондриальному пути» и по *p53*-индуцированному сигнальному пути является максимальным на 20-й минуте реперфузии. Какой именно из этих механизмов реализуется, будет зависеть от индивидуальных паттернов транскрипционной активности исследованных генов у каждого пациента.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Матвеев ВБ, Перлин ДВ, Фигурин КМ, Волкова МИ. Органосохраняющее лечение рака почки. *Практ онкол* 2005; (3):162-166 [Matveev VB, Perlin DV, Figurin KM, Volkova MI. Organosohranyayuschee lechenie raka pochki. *Prakticheskaya onkologiya* 2005; (3):162-166]
2. Смирнов АВ, Каюков ИГ, Добронравов ВА, Румянцев АШ. Острое повреждение почек: концептуальные проблемы. *Нефрология* 2014;18(2):8-24 [Smirnov AV, Kaiukov IG, Dobronravov VA, Rumyantsev ASH. Ostroe povrezhdenie почек: kontseptualnye problemy. *Nefrologiya* 2014;18(2):8-24]
3. Liano F, Pascual J. Madrid acute renal failure study group. Epidemiology of acute renal failure: A prospective, multicenter, community-based study. *Kidney Int* 1996; (50): 811-818
4. Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; (9): 327-434
5. Zhang Y, Fu Z, Zhong Z et al. Hypothermic Machine Perfusion Decreases Renal Cell Apoptosis During Ischemia/Reperfusion Injury via the Ezrin/AKT Pathway. *Artificial Organs* 2015 doi: 10.1111/aor.12534
6. Burns AT, Davies DR, McLaren AJ et al: Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. *Transplantation* 1998;(66): 872-876
7. Becker F. Assessing the impact of ischemia time during partial nephrectomy. *European Urology* 2009; (56): 625-635
8. Tompson RH, Lane BR, Lohse CM et al: Renal function after partial nephrectomy: effect of warm ischemia relative to quantity and quality of preserved kidney. *Urology* 2012; 79(2): 356-360
9. Мосоян МС. Открытая, лапароскопическая и робот-ассистированная нефрэктомия при локализованном раке почки: что предпочесть? *Нефрология* 2014;18(6):76-81 [Mosoyan MS. Otkrytaia, laparoskopicheskai i robot-assistirovannai nefrektomiia pri lokalizovannom rake pochki: chto predpochest? *Nefrologia* 2014;18(6):76-81]
10. Sims NR, Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1802 (1): 80-91
11. Eckardt K-U, Bernhardt WW, Weidemann A et al. Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Kidney Int* 2005; 68:46-51
12. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 2006; 2: 581-585
13. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 2008; 3: 1101-1108
14. Коган МИ, Чибичян МБ, Водолажский ДИ. Изменение экспрессии генетических локусов в мононуклеарной фракции периферической крови больных раком предстательной железы. *Клин онкол* 2012; 5: 59-60 [Kogan MI, Chibichyan MB, Vodolazhskii DI. Izmenenie ekspressii geneticheskikh lokusov v mononuklearnoi fraktsii perifericheskoi krovi bol'nih rakom predstatel'noi zhelezi. *Klinicheskaya onkologiya* 2012; 5: 59-60]
15. Irmiler M, Thome M, Hahne M et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388(6638):190-195
16. Liston P, Roy N, Tamai K et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996; 379 (6563): 349-353
17. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13 (3): 239-252
18. Marzo I, Brenner C, Zamzani N. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998; 281: 2027-2031
19. Schendel SL, Azimov R, Pawlowski K. Ion channel activity of the BH3 only Bcl2 family member, BID. *J Biol Chem* 1999; 274: 21932-21936
20. Lakin ND, Stephen PJ. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 1999; 18(53): 7644-7655
21. Read AP, Strachan T. *Human molecular genetics*, 2nd ed. New York: Wiley, 1999
22. Мартынова ЕА. Регуляция активности каспаз в апоптозе. *Биоорганическая химия* 2003; 29(5): 518-543. [Martynova EA. Regulaciia aktivnosti kaspaz v apoptoze. *Bioorganicheskaja himija* 2003; 29(5): 518-543]
23. Ferreira P, Villanueva R, Martínez-Júlvez M et al. Structural insights into the coenzyme mediated monomer-dimer transition of the pro-apoptotic apoptosis inducing factor. *Biochemistry* 2014; 53 (25): 4204-4215

## Сведения об авторах:

Денис Сергеевич Кутилин, с.н.с., к.б.н.

Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63. Ростовский научно-исследовательский онкологический институт. Тел.: +7-951-538-50-39, e-mail: k.denees@yandex.ru

Denis S. Kutilin PhD

Affiliations: Russia, 344037, g. Rostov-na-Donu, ul. 14 liniia, 63 Rostov research institute of oncology. Tel.: +7-951-538-50-39

Сергей Николаевич Димитриади, с.н.с., врач-уролог, д.м.н.

Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63. Ростовский научно-исследовательский онкологический институт. Тел.: +7-928-279-17-90, e-mail: dimitriadi@yandex.ru

Senior research scientist Sergey N. Dimitriadi MD, PhD, DMedSci

Affiliations: Russia, 344037, g. Rostov-na-Donu, ul. 14 liniia, 63 Rostov research institute of oncology. Tel.: +7-928-279-17-90

Дмитрий Игоревич Водолажский, к.б.н.

Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63. Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, руководитель лаборатории молекулярной онкологии. Тел.: +7-989-611-09-10, e-mail: dvodolazhsky@gmail.com

Dmitrii I. Vodolazhsky, PhD

Affiliations: Russia, 344037, g. Rostov-na-Donu, ul. 14 liniia, 63 Rostov research institute of oncology, laboratory of molecular Oncology, chief. Tel.: +7-989-611-09-10, e-mail: dvodolazhsky@gmail.com

Елена Михайловна Франциянц, д.б.н.

Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63. Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей. Тел.: +7-918-535-43-88, e-mail: super.gormon@yandex.ru

Helena M. Frantcyantc PhD, DBiolSci

Affiliations: Russia, 344037, g. Rostov-na-Donu, ul. 14 liniia, 63 Rostov research institute of oncology, laboratory study of the pathogenesis of malignant tumors, chief

Проф. Олег Иванович Кит, д.м.н.

Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63. Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, директор. Тел.: +7 (863) 300-30-05, e-mail: onko-sekretar@mail.ru

Prof. Oleg I. Kit MD, PhD, DMedSci

Affiliations: Russia, 344037, g. Rostov-na-Donu, ul. 14 liniia, 63 Rostov research institute of oncology, director, Tel.: +7 (863) 300-30-05, e-mail: onko-sekretar@mail.ru

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

Поступила в редакцию: 20.06.2016 г.

Принята в печать: 05.12.2016 г.