

На правах рукописи

Золотухин Петр Владимирович

**ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТАТУСА И
РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПТОМА В ПРОЦЕССЕ
БЕРЕМЕННОСТИ**

03.03.01 - физиология

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

Майкоп – 2014

Работа выполнена в Академии биологии и биотехнологии ФГАОУ ВПО
«Южный федеральный университет».

- Научный руководитель:** **Шкурат Татьяна Павловна**
доктор биологических наук, профессор
- Официальные оппоненты:** **Колмакова Татьяна Сергеевна**
доктор биологических наук, профессор
заведующая кафедрой медицинской биологии
и генетики ГБОУ ВПО «Ростовский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ
- Горошинская Ирина Александровна**
доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник лаборатории
изучения патогенеза злокачественных
опухолей ФГБУ «Ростовский научно-
исследовательский онкологический институт»
Министерства здравоохранения РФ
- Ведущая организация:** **ФГБУ ГНЦ РФ «Институт медико-
биологических проблем» РАН**

Защита диссертации состоится 19 декабря 2014 г. в 09:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.001.07 при Адыгейском государственном университете по адресу: 385000, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Пионерская, 260, конференц-зал научной библиотеки АГУ.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке Адыгейского государственного университета, на сайте ВАК <http://www.vak.ed.gov.ru> и на сайте Адыгейского государственного университета www.adygnet.ru

E-mail: dissagu@yandex.ru

Автореферат разослан «___» ноября 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент

Н.Н. Хасанова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Изучение физиологических особенностей процесса беременности является актуальной задачей, решение которой направлено на сохранение репродуктивного здоровья женского организма - важнейшего социально значимого компонента общего здоровья. Течение беременности также в значительной степени определяет будущее здоровье ребенка и имеет значительные отдаленные социальные последствия (Погорелова Т.Н. и др., 1999; Зайцева Л.Ю., Калущий П.В., 2012; Шогенова Ф.М., 2012; Гинзбург Б.Г., 2013; Эверт Л.С. и др., 2013; Башмакова Н.В. и др., 2014; Колесникова С.М., 2014; Liu X. et al., 2013; Makarova E.N. et al., 2013; Nathanielsz P.W. et al., 2013; Aris I.M. et al., 2014; Dreier J.W. et al., 2014; Haugen M. et al., 2014).

Беременность является состоянием, характеризующимся значительным изменением физиологических показателей, в том числе, гормонального, метаболического и гомеостатического характера (Гармашева Н.Л., Константинова Н.Н., 1985). Такие изменения предполагают в первую очередь изменение окислительного статуса, интегрирующего состояние различных клеточных систем и организма в целом. В различных исследованиях в прошлые годы показаны постепенные изменения отдельных маркеров или компонент окислительного статуса при беременности (Lash G.E. et al., 2008; Vanderlelie J. et al., 2008; Al-Gubory K.H. et al., 2010; Roland-Zejly L. et al., 2011; Miranda Guisado M.L. et al., 2012; Das B. et al., 2012). Однако практически отсутствуют исследования, в которых детально характеризуются тип окислительного стресса и динамика взаимоотношений между про- и антиоксидантными системами при физиологической гестации с позиций системной клеточной биологии.

Помимо фундаментальной необходимости изучения окислительного статуса физиологической беременности, в последние годы большое внимание уделяется роли окислительного статуса организма беременной женщины при различных дисфункциональных отклонениях гестации (Reyes M. et al., 2006; Vanderlelie J. et al., 2008; Tjoa M.L. et al., 2006; Lash G.E. et al., 2008; Aris A. et al., 2009; Warren J.E., Silver R.M., 2009; Al-Gubory K.H. et al., 2010; Olsson M.G. et al., 2010; Owen J., Mancuso M., 2012). Однако для большинства из них остается открытым вопрос о причинах и закономерностях нарушений адаптивного потенциала про- и антиоксидантной систем клетки, ведущих к наблюдаемому и описываемому в литературе дисбалансу окислительного статуса. Тогда как исследования окислительного статуса при различных дисфункциональных нарушениях беременности позволяют глубже провести анализ характеристик и изучение механизмов генетических, молекулярных и биохимических процессов, определяющих течение физиологической беременности.

Окислительный статус контролирует функционирование значительного числа редокс-чувствительных сигнальных каскадов и транскрипционных факторов, которые, в свою очередь, регулируют активность генома и определяют состояние транскриптома влияющего на окислительный статус (Levy S. et al., 2009; Persichini T. et al., 2010). Таким образом, окислительный статус замыкает один из крупнейших глобальных регуляторных клеточных контуров обратных

связей. Однако исследования, учитывающие интегративные свойства окислительного статуса, не проводились. Тогда как для более полного понимания регуляции клеточных процессов, особенно при таком динамичном состоянии, как беременность, необходима интеграция omных данных, осуществляемая интерактомикой. Существующие алгоритмы разработки интерактомных систем ограничивают возможности интерпретации получаемых данных об уровне физиологических аналитов в клетке.

В этом плане системно-биологическое изучение закономерностей регуляции клеточных систем посредством исследования окислительного статуса и контроля транскриптома открывает широкие перспективы для исследования физиологии беременности, позволяет получить широкий спектр данных, характеризующих состояние отдельных компонентов окислительного статуса и транскриптома в процессе беременности и открывает возможность сформулировать проблему оценки состояния регуляторных каскадов окислительного статуса и контроля активности генома при гестации на основе интегративного подхода.

Цель диссертационного исследования: изучить особенности окислительного статуса и регуляции транскриптома в процессе физиологической беременности.

Задачи исследования:

1. Установить наиболее значимые для физиологического течения беременности регуляторные каскады про- и антиоксидантной систем с помощью интерактомикой окислительного статуса;

2. Изучить динамику интегральных показателей окислительного статуса крови и установить особенности его формирования в различные периоды протекания беременности;

3. Определить уровни циркулирующего тиоредоксина 1 в процессе беременности;

4. Оценить состояние адаптивных каскадов антиоксидантной системы и деструктивных контуров прооксидантной системы при беременности;

5. Провести сравнительный полногеномный транскриптомный анализ тканей хориона, эндометрия и плацент женщин с физиологическим течением гестационного процесса и с его дисфункциональными отклонениями.

Теоретико-методологическая основа исследования. В методологической основе исследования лежат системный подход (Анохин П.К., 1970; Sanchez C. et al., 1999; Papp D. et al., 2012); интерактомное профилирование состояния клеточных каскадов (Ross J.S. et al., 2008); принцип интеграции окислительного статуса в метаболическую и сигнальную системы клетки с использованием регуляторных клеточных контуров обратных связей (Ushio-Fukai M., 1998; Lee R. et al., 2012); принцип функциональной кластеризации компонентов транскриптома (Ausubel F.M. et al., 2003).

Теоретической основой проекта являются идеи о функциональной системе (Анохин П.К., 1970); об интегративных свойствах сигнальных каскадов (Parikh J.R. et al., 2010); функциональной классификации компонентов окислительного статуса (Cullinan S.B., Diehl J.A., 2006); о клеточных каскадах антиоксидантной

защиты клетки (Kim Y.C. et al., 2003; Jaiswal A.K., 2004; Iwasaki K. et al., 2006; Dinkova-Kostova A.T., Talalay P., 2010; Poljsak B., Milisav I., 2012); роли нарушения работы адаптивных каскадов в развитии дисфункциональных отклонений (Wruck C.J. et al., 2009; Poljsak B., Milisav I., 2012); составе циркулирующих в крови компонентов систем окислительного статуса (Glantzounis G.K. et al., 2005; Sautin Y.Y. et al., 2007; Bao X.M. et al., 2010; Yu M. et al., 2011; Sipkens J.A. et al., 2012); способах функциональной категоризации компонентов транскриптома (Luiking Y.C. et al., 2010; Papp D. et al., 2012).

Научная новизна работы заключается в том, что в рамках настоящего исследования впервые:

- с помощью разработанной в данном исследовании карты интерактома окислительного статуса человека выявлено, что в работе систем окислительного статуса у человека, в том числе в процессе беременности, большое значение имеет функционирование положительных и отрицательных контуров обратных связей; один из наиболее деструктивных положительных контуров прооксидантной системы включает НАДФ•Н-оксидазы, ксантиноксидоредуктазу, мочевую кислоту и гомоцистеин, тогда как функционирование значительной части антиоксидантной системы взаимозависимо с экспрессией регуляторного белка тиоредоксина 1;

- выявлено возрастание в процессе физиологической беременности интенсивности прооксидативных процессов в крови, сопровождающееся постепенным увеличением антиоксидантной емкости и падением роли тиоредоксин 1-зависимых контуров ее регуляции к концу беременности; обнаружены индукторные эффекты мочевой кислоты на тиоредоксин 1 в первом триместре гестации, показано, что при физиологической гестации замыкание высоко деструктивного контура NOX/XOR не происходит;

- установлены диапазоны содержания тиоредоксина 1 в плазме крови беременных по триместрам гестации у человека и выявлены особенности его функционального вовлечения в контроль окислительного статуса в процессе беременности - положительные корреляционные связи с мочевой кислотой в первом триместре, светосуммой и стабилизированной ХЛ во втором и третьем триместрах физиологической гестации со снижением роли в контроле окислительного статуса к концу беременности;

- выявлены отклонения окислительного статуса и регуляции транскриптома при дисфункциональных нарушениях беременности: установлены окислительный стресс, вызванный дисфункцией антиоксидантных систем, а также значительное повышение экспрессии фактора 3, родственного ядерному эритроидному фактору 2 (*NFE2L3*), и нарушение экспрессии генов, связанных с иммунной функцией организма в хорионах при самопроизвольном прерывании беременности; показан характер мажорного эффекта контура положительных обратных связей тиоредоксина 1 в обеспечении функционирования антиоксидантной системы на клеточном уровне при неразвивающейся беременности, установлен аномальный характер нарушения окислительного статуса при истмико-цервикальной недостаточности - дисфункция прооксидантных систем; выявлены множественные минорно-эффекторные нарушения функционирования клеточных систем, а также значительное

повышение экспрессии *NFE2L3* и снижение экспрессии *NFE2L1* при осложнении беременности третьего триместра.

Положения, выносимые на защиту:

1. В работе систем окислительного статуса у человека, в том числе в процессе беременности, большое значение имеет функционирование положительных и отрицательных контуров обратных связей. Один из наиболее деструктивных положительных контуров прооксидантной системы включает НАДФ•Н-оксидазы, ксантиноксидоредуктазу, мочевую кислоту и гомоцистеин, тогда как функционирование значительной части антиоксидантной системы взаимозависимо с экспрессией редокс-регуляторного белка тиоредоксина 1.

2. Во втором триместре, относительно первого триместра, нарастает интенсивность прооксидативных процессов, а параллельно этому, особенно к концу третьего триместра, повышается антиоксидантная емкость сыворотки крови. Замыкание высоко деструктивного контура NOX/XDH во всех трех триместрах физиологической беременности не происходит.

3. Динамика общего окислительного статуса при физиологическом течении беременности определяется изменением не только интенсивности прооксидантных процессов, но и функциональным состоянием антиоксидантных систем: тиоредоксин 1 в значительной степени вовлечен в контроль окислительного статуса при беременности, на что указывают его положительные корреляционные связи с быстрой вспышкой, светосуммой, стабилизированной ХЛ; к середине беременности возрастает, затем к концу беременности снижается роль тиоредоксин-зависимых антиоксидантных контуров, тогда как содержание тиоредоксина 1 в крови беременной женщины относительно стабильно в первом и втором триместрах и снижается в конце гестации.

4. Дисфункциональные нарушения гестации характеризуются специфическими отклонениями окислительного статуса и регуляции транскриптома. При самопроизвольном прерывании беременности окислительный стресс связан с дисфункцией антиоксидантных систем. При неразвивающейся беременности контур положительных обратных связей тиоредоксина 1 имеет характер мажорного эффекта в обеспечении функционирования антиоксидантной системы на клеточном уровне, а при истмико-цервикальной недостаточности нарушена функция прооксидативных систем организма на фоне отсутствия гиперактивации антиоксидантной системы; при осложнении беременности третьего триместра отсутствуют значительные нарушения общего окислительного статуса и не происходит замыкание мощных деструктивных контуров.

5. В хорионах при самопроизвольном аборте и в плаценте при осложнении третьего триместра изменено состояние транскриптома, нарушена работа одного из центральных адаптивных контуров антиоксидантной системы человека - каскада фактора 2, родственного ядерному эритроидному фактору 2; в тканях хориона нарушена экспрессия генов, связанных с иммунной функцией организма; в эндометрии отличия от физиологической беременности отсутствуют, что указывает на первичную роль регуляции генома плода, а не матери в развитии локальных предпосылок спонтанного аборта.

Теоретическая значимость работы. В рамках исследования разработан принципиально новый аналитический подход, основанный на применении карты интерактома окислительного статуса, для планирования исследований, обработки и интерпретации данных. В общетеоретическом плане полученные результаты расширяют представления о биохимических процессах, сопровождающих физиологическое течение беременности, о динамике окислительного статуса организма женщины в процессе беременности, механизмах функционирования клеток, тканей, органов, принципов их системной организации.

Результаты исследования особенностей окислительного статуса на разных этапах гестации углубляют современные представления о закономерностях и механизмах поддержания постоянства внутренней среды организма. Данные о роли тиоредоксина 1 в формировании окислительного статуса и результаты применения системного подхода к изучению процесса гестации дополняют теорию о молекулярных и биохимических процессах, определяющих динамику, взаимодействие и интеграцию физиологических функций.

Практическая значимость. В рамках исследования создана карта интерактома окислительного статуса человека, с помощью которой выявлены регуляторные контуры про- и антиоксидантной систем, анализ которых использовался для изучения физиологии беременности. В результате проведения комплексных исследований по изучению особенностей регуляции транскриптома и контроля окислительного статуса при различных вариантах беременности получены новые данные, позволяющие планировать исследовательскую работу в области многомерных молекулярно-биологических и биомедицинских исследований от теоретического до экспериментального уровня; проводить многомерный анализ экспериментальных молекулярно-биологических и биохимических данных, разрабатывать качественно новые подходы к дифференциальной диагностике сложных, гетерогенных групп заболеваний; находить новые пути к определению этиологии некоторых заболеваний, таких как тяжелый гестоз, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, инсулинрезистентные состояния и др.

Разработан и апробирован оригинальный алгоритм применения интерактомных данных для целей практической биомедицины и проведения фундаментальных исследований в области эмбриологии. Методологической особенностью использованного подхода в работе является то, что оценивались в большей степени не концентрации или активность отдельных факторов, а состояния каскадов, их регулирующих.

Апробация работы. Материалы диссертации представлялись на международной научно-практической конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине" (Санкт-Петербург, 2011); на IV и V международных научно-практических конференциях "Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины" (Ростов-на-Дону, 2011; 2013); на I-III международных научно-практических конференциях "Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине" (Москва, 2010; Новосибирск, 2011; Казань, 2012); на 49-й и 51-й международных научных студенческих конференциях «Студент и научно-

технический прогресс» (Новосибирск, 2011; 2013); на VI региональном и XII всероссийском научных форумах «Мать и дитя» (Москва, 2011; Ростов-на-Дону, 2012); на XIX международной конференции "Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии" (Украина, Гурзуф, 2011); всероссийской научно-практической конференции "Модернизация науки и образования" (Махачкала, 2011); на I международном форуме «Молекулярная медицина – новая модель здравоохранения XXI века: технологии, экономика, образование» (Санкт-Петербург, 2013); на международном семинаре «Nanodesign: Physics, Chemistry, Computer Modelling» (Ростов-на-Дону, 2013); научных сессиях факультета биологических наук ЮФУ (2009 – 2013 гг.); на 81-й всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины» (Иркутск, 2014); на 8-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» (Москва, 2014); на 18-й международной школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, 2014).

По теме диссертационного исследования опубликовано 39 работ, в том числе 12 из них в периодических изданиях из Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание искомой ученой степени.

Внедрение результатов исследования. Полученные в результате выполнения работы новые экспериментальные данные внедрены в лабораторную и практическую деятельность КДЛ «Наука», МЛПУЗ «Городская поликлиника № 42», МЛПУЗ «Городская больница № 20», ООО «Центр репродукции человека и ЭКО», кафедры Акушерства и гинекологии № 1 РостГМУ, а также используются при чтении лекций и проведении семинаров в общих курсах «Биология развития и размножения» и «Биоинформационные базы данных» и специальных курсах «Предиктивная медицина», «Медицинская генетика», «Генетика человека» и «Генетика репродукции» в Южном федеральном университете и Ростовском государственном медицинском университете. Карта интерактома окислительного статуса человека используется в лабораториях генетики человека ЮФУ, экспериментального мутагенеза ЮФУ, группы биоинформатики кафедры алгебры и дискретной математики ЮФУ, кафедры биологии, медицинской генетики и экологии Курского ГМУ, МГНЦ РАМН, ВНИИВВиМ РАСХН, в лаборатории окислительного стресса и на факультете медицины университета Любляны (Словения), в компании InterMune (США), центре водных и морских ресурсов Канады, на кафедрах генетики университетов земли Саар (Германия) и Будапештского университета (Венгрия).

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 03.03.01 - физиология по областям исследования: 1. Изучение закономерностей и механизмов поддержания постоянства внутренней среды организма; 2. Анализ механизмов нервной и гуморальной регуляции, генетических, молекулярных, биохимических процессов, определяющих динамику и взаимодействие физиологических функций; 5. Исследование динамики физиологических

процессов на всех стадиях развития организма; 6. Изучение механизмов функционирования клеток, тканей, органов, принципов их системной организации; 11. Изучение молекулярной и интегративной организации физиологических функций.

Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки РФ БЧ № 213.01-11/2014-32 “Разработка фундаментальных аспектов молекулярной диагностики и митохондриальной фармакологии”, в рамках гранта ФЦП “Разработка технологии мониторинга репродуктивной функции человека и развития плода с использованием новых геномных и постгеномных маркеров” (ГК № 02.740.11.0501), гранта “Разработка способа индивидуальной оценки течения беременности и развития плода” (проект № 13153 программы У.М.Н.И.К. Фонда содействия развития малых форм предприятий в научно-технической сфере), гранта ФЦП “Системный биоинформационный анализ интерактома окислительного статуса клеток различных тканей человека” (соглашение № 14.132.21.1315).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 177 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, организации и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы, включающего 23 отечественных и 210 зарубежных источников, четырех приложений. Работа содержит 19 таблиц, иллюстрирована 41 рисунком.

ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на базе Академии биологии и биотехнологии ЮФУ. Все исследования проводились с соблюдением биоэтических норм и требований.

В исследовании приняли участие беременные женщины на разных сроках физиологически протекающей гестации (всего 131 участница): в первом (5-8 недель; N=18; группа K1), втором (14-25 недель; N=42; группа K2) и третьем (37-41 недель; N=71; группа K3) триместрах.

Обследованные на момент исследования находились на учете в родовспомогательных учреждениях г. Ростова-на-Дону (роддоме № 5; городской больнице № 8; кафедре акушерства и гинекологии Ростовского государственного медицинского университета). Все женщины, принявшие участие в исследовании были анкетированы, ими было подписано информированное согласие на участие в исследованиях.

В исследовании приняли участие условно здоровые женщины, которые до настоящей беременности и в течение ее не имели в анамнезе выраженной соматической патологии: витаминдефицитных состояний (витамины B6, B12), сахарного диабета, гипотиреоза, а также инфекционных патологий. У всех обследованных фиксировались показатели роста, массы, систолического и диастолического давления, рассчитывался индекс массы тела.

Отдельная серия экспериментов была проведена с участием женщин с дисфункциональными нарушениями беременности (всего 68 участниц):

спонтанным абортom (5-8 недель; N=18; группа сравнения 1 - СА) и неразвивающейся беременностью (5-8 недель; N=19; группа сравнения 2 - НБ) в первом триместре, истмико-цервикальной недостаточностью во втором триместре (14-25 недель; N=17; группа сравнения 3 - ИЦН) и тяжелым гестозом в третьем триместре (37-41 недель; N=14; группа сравнения 4 - ТГ). Все участницы исследования родились и проживали в Ростовской области и г. Ростове-на-Дону.

Алгоритм анализа данных для разработки интерактивной схемы интерактома окислительного статуса человека был разработан на основании проведения масштабного анализа литературных данных, а также обобщения международного опыта создания генных и интерактомных сетей. Поиск данных для создания карты интерактома проводили в NCBI PubMed. Наименования генов приводились согласно постановлениям консорциума HGNC.

Хемилюминесцентное исследование сыворотки крови проводилось в системе перекись-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции с помощью хемилюминометра Autolumat Plus LB953 (Berthold Technologies, Германия). Снимались показатели интенсивности хемилюминесценции за 100 с. Содержание мочевой кислоты в сыворотке крови определяли с помощью коммерческих наборов (Ольвекс, Россия). Абсорбционные исследования проводили с помощью спектрофотометра Smart Spect Plus (BioRad, США). Концентрацию гомоцистеина в сыворотке и тиоредоксина 1 в плазме крови определяли иммуноферментным методом на анализаторе «Alisei» (Radim, Италия) с использованием тест-систем «Homocysteine 96» (Axis-Shield Diagnostics, Норвегия) и «Human TRX-1 ELISA kit» (ABfrontier, Южная Корея).

Транскриптомное исследование проводилось с помощью чипов Illumina Human HT12 в тканях хориона и эндометрия у обследованных из групп первого триместра и в образцах центральной части плаценты у обследованных из групп третьего триместра. Все процедуры, требующие специальное оборудование для транскриптомики, проводились с помощью комплекса оборудования Illumina Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridization Assay System. По окончании транскриптомных исследований был проведен трехступенчатый контроль качества проведения исследования, включающий анализ качества работы чипа, анализ качества образцов и пост-статистический анализ значимости особенностей выявляемых экспрессионных профилей. Исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Высокие технологии» ЮФУ.

Статистические расчеты проводились в средах Statistica 6.1 (StatSoft, США), MedCalc 11.4.2 (MedCalc Software, Бельгия), GenomeStudio (Illumina, США), Chipster (CSC, Финляндия). Данные биохимических исследований представлены в формате [медиана]; [25 перцентиль]..[75 перцентиль].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Создание и анализ карты интерактома окислительного статуса человека. Для выбора наиболее информативных маркеров для целей исследования и повышения информативности анализа биохимических и транскриптомных данных была создана интерактивная схема интерактома

окислительного статуса человека. С помощью нее были отобраны компоненты окислительного статуса, анализ содержания которых в крови отражает состояние внутриклеточных сигнальных каскадов - благодаря секретлируемости таких компонентов или их влиянию на клеточные процессы извне клетки. Интегральный хемилюминесцентный анализ был также выбран по результатам анализа карты интерактома по причине того, что оценка изменения концентраций или состояния отдельных компонентов окислительного статуса (активности глутатионпероксидаз, супероксиддисмутаза, каталазы) не дает достаточной информации для характеристики общей эффективности работы адаптивных каскадов: индивидуальные нарушения работы ферментов могут быть скомпенсированы без изменения общего окислительного статуса (например, дисфункции глутатионпероксидаз могут быть компенсированы повышением активности пероксиредоксинов).

Карта интерактома окислительного статуса построена по принципу кристаллизации вокруг одного из центральных антиоксидантных транскрипционных факторов - NFE2L2. Интерактивная схема интерактома была построена в среде CellDesigner, для ее создания было проанализировано более 700 литературных источников, отобранных с помощью NCBI PubMed.

В интерактивной схеме окислительного статуса человека представлены: 10 каскадов обработки внешних для клетки сигналов; 13 сопряженных прооксидантных метаболических систем; 355 операторных и сопряженных антиоксидантов, операторных прооксидантов, включая индуцибельные факторы; 35 низкомолекулярных соединений и групп соединений; 587 взаимодействий между компонентами окислительного статуса, подтвержденных 905 ссылками.

По результатам анализа интерактома окислительного статуса были выявлены несколько деструктивных контуров положительных обратных связей, которые, согласно экспериментальным данным, в случае их замыкания приводят к гибели клетки, которая содержит достаточный набор компонентов таких контуров, и один из наиболее значимых таких контуров - это контур НАДФ•Н-оксидаза (NOX), ксантиноксидоредуктазы (XDH), мочевой кислоты и гомоцистеина. Аналогичным образом были выявлены адаптивные контуры антиоксидантной защиты клеток, центральное место в работе которых занимает тиоредоксин 1, который может использоваться для анализа состояния каскадов антиоксидантной защиты при наличии данных об общем окислительном статусе внутренней среды организма.

Динамика интегральных показателей окислительного статуса в процессе беременности. Динамика интегральных показателей окислительного статуса при физиологически протекающей беременности характеризовалась повышением прооксидантного потенциала плазмы крови в середине второго триместра относительно середины первого (таблица 1).

Таблица 1

Интегральные показатели окислительного статуса сыворотки крови в динамике физиологической гестации

Показатель	Исследуемые группы		
	К1	К2	К3
Быстрая вспышка, о.е.	205,7; 102,7..348,2	*336,7; 201,3..649,4	214,4; 124,3..377,8
Светосумма, о.е.	90,5; 24,9..114,3	98,7; 67,7..201,3	80,7; 43,1..138,3
Стабилизированная ХЛ, о.е.	85,5; 21,8..110,8	86,1; 59,1..175,5	‡70,0; 38,2..111,1
Индекс М/50	4,9; 4,2..5,4	*5,8; 5,0..7,7	4,9; 4,4..6,0
Индекс М/S	4,6; 4,0..4,9	*5,2; 4,7..6,3	4,6; 4,1..5,2
Нормализованный М/50	1070,3; 579,0..1623,8	*2305,3; 163,6..4200,9	1113,2; 609,3..2523,6

* - статистически значимые отличия группы К2 от групп К1 и К3, $p < 0,05$; ‡ - статистически значимые отличия группы К3 от группы К2, $p = 0,047$ (KW $p = 0,06$); † - статистически значимые отличия группы К3 от групп К1 и К2, $p < 0,05$; ▲ - по данному показателю статистически значимо отличаются все группы, $p < 0,05$

К концу беременности величины интегральных параметров окислительного статуса снижались и принимали величины, характерные для середины первого триместра.

По результатам анализа индексов М/50 и М/S была обнаружена активация антиоксидантной системы у обследованных с физиологическим течением гестации во втором триместре - относительно групп первого и третьего триместров, что полностью согласуется с идеей о контролируемом клетками изменении емкостей про- и антиоксидантной систем после снятия блокады трофобластом спиральных артерий (Chamy V.M. et al., 2006; Tjoa M.L. et al., 2006).

При этом по данным комбинированного анализа светосуммы и стабилизированной ХЛ выявлялись отличия в характере работы антиоксидантной системы в середине и конце беременности: на фоне повышенной склонности сыворотки крови к прооксидантным процессам во втором триместре и повышенной антиоксидантной активности сыворотки в третьем триместре, на этих сроках не выявлялись отличия по показателю светосуммы, что свидетельствовало о разных кинетических характеристиках взаимоотношений про- и антиоксидантной систем, а значит и о разных качественных характеристиках их компонентов, в начале, середине и в конце беременности.

Содержание мочевой кислоты составило 3,6; 3,0..4,1 мг/дл в первом триместре, 3,6; 3,1..4,1 мг/дл во втором триместре и 4,9; 4,1..5,9 мг/дл в третьем триместре. Повышение циркулирующих концентраций мочевой кислоты в конце беременности статистически значимо ($p < 0,05$). Наблюдаемая динамика содержания мочевой кислоты в крови беременных при физиологической гестации согласуется с описанной в литературе и объясняемой повышением экскреции мочевой кислоты из кровотока плода в кровотоки матери к концу беременности (Carter J., Child A., 1989; Lain K.Y. et al., 2005).

Концентрации гомоцистеина составили 9,3; 8,2..11,6 мкМ в первом триместре, 7,1; 6,2..7,8 мкМ во втором триместре и 8,4; 7,4..9,7 мкМ в конце беременности. Во втором триместре уровни гомоцистеина были ниже, чем в первом триместре и в конце беременности ($p < 0,05$). Наблюдаемая динамика

содержания гомоцистеина в крови при физиологическом течении беременности подтверждает данные, полученные в других лабораториях (Ozkan Y. et al., 2006). Кроме того, во втором триместре беременности была обнаружена положительная корреляция между гомоцистеином и мочевой кислотой ($r=0,398$, $p=0,012$). Объяснением этого важного для контроля окислительного статуса феномена может быть то, что аденозин, являющийся субстратом окисления до мочевой кислоты, является, в том числе, продуктом метаболизма S-аденозил-гомоцистеина, предшественника гомоцистеина (Motti C. et al., 1998).

На основе данных об уровнях, динамике и связях мочевой кислоты и гомоцистеина с другими показателями окислительного статуса был сделан вывод о том, что замыкание высоко деструктивного контура NOX/XDH на исследованных сроках не происходит.

В нашем исследовании тиоредоксин 1 был в значительной степени вовлечен в регуляцию окислительного статуса и выражено сам зависел от него при физиологическом течении беременности. Благодаря корреляционному анализу нами было выявлено, что взаимосвязь между общим окислительным статусом и белковой экспрессией тиоредоксина 1 имеет специфику на разных сроках беременности (рис. 1). Так, во втором триместре беременности тиоредоксин 1 средне коррелировал со светосуммой ($r=+0,49$; $p=0,0334$) и стабилизированной ХЛ ($r=0,50$; $p=0,0306$). В третьем триместре значения коэффициентов корреляции снижались и составили $r=+0,31$ ($p=0,0118$) между тиоредоксином и быстрой вспышкой, $r=+0,27$ ($p=0,0278$) между тиоредоксином 1 и светосуммой и $r=+0,29$ ($p=0,0194$) между тиоредоксином и стабилизированной ХЛ.

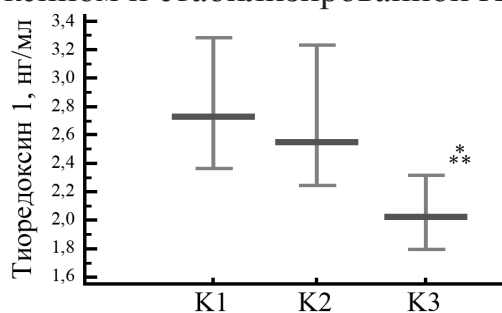


Рис. 1. Содержание тиоредоксина 1 в крови на разных этапах физиологической гестации. ✱ - статистически значимые отличия группы K3 от групп K1 и K2, $p<0,05$

Характер изменений в окислительном статусе был различным при изученных дисфункциональных нарушениях беременности в зависимости от срока гестации. В первом триместре беременности у обследованных группы сравнения 1 наблюдалось повышение прооксидантного потенциала сыворотки крови при отсутствии активации антиоксидантной защиты, т.е. был выявлен истинный окислительный стресс, что оказалось нехарактерно для группы сравнения 2 (рис. 2).

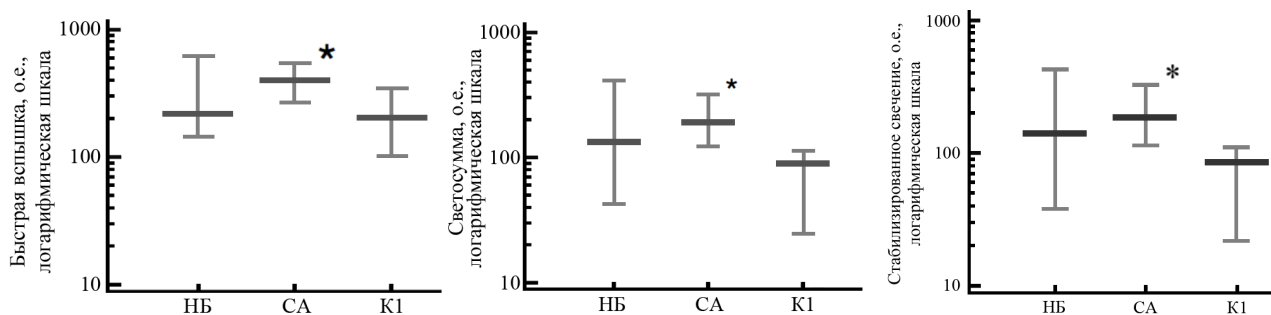


Рис. 2. Сравнение основных показателей хемилуминесцентного анализа при физиологическом течении гестации и в группах сравнения первого триместра. * - $p < 0,02$ - статистически значимые отличия группы сравнения 1 (СА) от контроля

Особенностями окислительного статуса в группе сравнения 2 явились, во-первых, повышенное значение тиоредоксина 1 для формирования антиоксидантной емкости и, во-вторых, инверсная корегуляция мочевого кислоты и суммарной антиоксидантной мощности образца: сильно отрицательно коррелировала с тиоредоксином 1 ($r = -0,76$; $p = 0,028$), а комплексный показатель содержания мочевого кислоты и гомоцистеина, рассчитанный как средний ранг концентраций мочевого кислоты и гомоцистеина сильно отрицательно коррелировал с индексом M/50 ($r = -0,83$; $p = 0,0416$). Возможными объяснениями этому могут быть, во-первых, активация транссульфурации гомоцистеина в цистеин, вызванная выявленными аномалиями работы вспомогательных контуров антиоксидантной системы (Vitvitsky V. et al., 2003); во-вторых, антиоксидантная активность мочевого кислоты (Кения М.В. и др., 1993); в-третьих, цитоплазматическая блокировка конверсии ксандиндегидрогеназы в ксантинооксидазу тиоредоксином 1 и его зависимыми контурами, как это характерно, например, для редокс-пути активации NF-kB (Hirota K. et al., 1999).

При дисфункциональном отклонении во втором триместре были выявлены нарушения систем окислительного статуса, характеризующиеся пониженной активностью прооксидантных компонент на фоне отсутствия гиперактивации антиоксидантных каскадов (рис. 3).

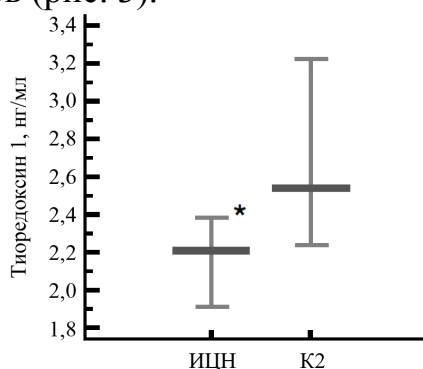


Рис. 3. Содержание тиоредоксина 1 в крови женщин с физиологически протекающей беременностью и в группе сравнения во втором триместре. * - $p < 0,05$ - статистически значимые отличия между группами

При физиологически протекающей беременности в третьем триместре интегральные показатели окислительного статуса - быстрая вспышка и светосумма хемилуминесценции - не обнаруживали отличий от группы

сравнения. Также между этими группами не было выявлено выраженных отличий по содержанию в крови тиоредоксина 1. На фоне имеющихся литературных данных о смещениях в активности отдельных про- и антиоксидантных систем (Aris A. et al., 2009) и о наблюдавшемся в ряде исследований повышении содержания маркеров окислительного повреждения биополимеров, выявленная нами результирующая взаимодействий про- и антиоксидантных систем может быть объяснена компенсаторным характером изменений функционирования отдельных защитных систем. В таком случае нарушения работы систем окислительного статуса не приводят к неконтролируемой гиперпродукции активных форм кислорода и окислительному стрессу, но оказываются ассоциированными со смещениями в работе смежных каскадов, которые, в свою очередь, принимают характер множественных минорных эффектов.

На фоне отсутствия значительных отличий по интегральным показателям окислительного статуса, в группе сравнения третьего триместра было выявлено повышение уровней мочевой кислоты и гомоцистеина (рис. 4).

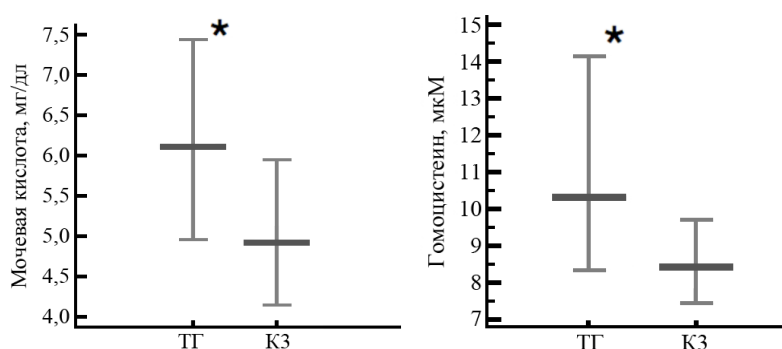


Рис. 4. Содержание мочевой кислоты (слева) и гомоцистеина (справа) в крови женщин при физиологически протекающей беременности и в группе сравнения в третьем триместре. * - $p < 0,04$ - статистически значимые отличия между группами

Повышенная концентрация мочевой кислоты, даже в отсутствии окислительного стресса может быть непосредственным участником генеза рассматриваемого дисфункционального отклонения беременности: блокировка мочевой кислотой продукции монооксида азота эндотелиоцитами делает вклад в развитие эндотелиальной дисфункции, характерной для данного состояния (Punthumapol C., Kittichotpanich B., 2008).

Таким образом, с помощью выбранных компонент таких контуров были установлены уникальные кинетические характеристики взаимоотношений про- и антиоксидантной систем в начале, середине и в конце физиологически протекающей беременности. Была обнаружена активация антиоксидантной системы у обследованных с физиологическим течением гестации во втором триместре - относительно групп первого и третьего триместров. На основе данных об уровнях, динамике и связях мочевой кислоты и гомоцистеина с другими показателями окислительного статуса был сделан вывод о том, что замыкание высоко деструктивного контура NOX/XDH на исследованных сроках не происходит. Также установлено, что характер взаимоотношений между мочевой кислотой, гомоцистеином и общим окислительным статусом при беременности динамичен. Тиоредоксин 1 в значительной степени вовлечен в

регуляцию окислительного статуса и выражено сам зависит от него при физиологическом течении беременности. Было выявлено, что взаимосвязь между общим окислительным статусом и белковой экспрессией тиоредоксина 1 имеет специфику на разных сроках беременности. Были обнаружены индукторные эффекты мочевой кислоты на тиоредоксин 1 на начальных этапах беременности. Окислительный статус в группе сравнения 1 в первом триместре характеризовался окислительным стрессом, в основе которого лежала не гиперактивация высокодеструктивного контура NOX/XDH, а дисфункция антиоксидантных систем. Особенности окислительного статуса группы сравнения 2 являются, во-первых, повышенная роль тиоредоксина 1 в формировании антиоксидантной емкости и, во-вторых, инверсная корегуляция мочевой кислоты и суммарной антиоксидантной мощности образца. В группе сравнения 3 во втором триместре выявлена дисфункция систем окислительного статуса, характеризующаяся пониженной активностью прооксидантных компонент на фоне отсутствия гиперактивации антиоксидантных каскадов. В группе сравнения 4 третьего триместра не было выявлено значительных смещений в интегральных показателях окислительного статуса, что, с учетом литературных данных, по-видимому, объясняется активацией компенсаторных, заместительных взаимодействий между антиоксидантными каскадами. Полученные данные указывают на наличие при рассматриваемом дисфункциональном отклонении беременности третьего триместра множественных минорно-эффекторных нарушений в работе клеточных каскадов, сопряженных с системами окислительного статуса.

Особенности регуляции транскриптома в хорионе и эндометрии в первом триместре и в плаценте в третьем триместре. В рамках настоящего исследования было проведено изучение полногеномной экспрессии с целью выявления особенностей регуляции транскриптома хориона и эндометрия в первом триместре и плаценты в третьем триместре физиологической беременности, по сравнению с группами сравнения 1 и 4, соответственно, с помощью чипов Human HT12.

С помощью проведенного анализа в тканях хориона были обнаружены отличия между группой с физиологическим течением беременности и группой сравнения в контроле активности генов 178 различных функциональных систем по классификации Gene Ontology (GO) - от контролирующих отдельные метаболические процессы и до задействованных в регуляции клеточных сигнальных каскадов. Результаты пермутационного тестирования методом SAM согласовались с результатами Бэйесовского теста функциональных различий транскриптома исследуемых биологических репликатов. Анализ множеств категорий по GO, для которых установлена важная роль в поддержании физиологической беременности, позволил выявить 88 категорий процессов, совпадающих при обработке данных по Бэйесу и с помощью SAM. Анализ представленности функциональных групп позволил установить, что самая крупная группа родственных GO-категорий связана с функционированием иммунной системы. В то же время статистический анализ данных, полученных при транскриптомном профилировании образцов тканей эндометрия первого триместра, не выявил значимых отличий между группами.

Вместе полученные результаты профилирования эндометрия и хориона указывают на важнейшую роль иммунных факторов плодовых оболочек и активности генома плода в физиологическом протекании ранней беременности.

Нами не были выявлены статистически значимые отличия характеристик транскриптома между группами третьего триместра при категоризации по GO.

В связи с ограничениями функциональной категоризации по Gene Ontology (Parikh J.R. et al., 2010), и для повышения эффективности анализа биохимических и транскриптомных данных, нами была использована интерактивная схема интерактома окислительного статуса человека. С ее использованием был проведен анализ особенностей состояния про- и антиоксидантной систем на уровне транскриптома у исследуемых групп первого и третьего триместра.

Методом пермутационного тестирования с помощью SAM нами выявлены нарушения экспрессии 11 взаимодействующих генов систем окислительного статуса в образцах хориона группы сравнения первого триместра: *FOSB*, *FOXO1*, *HMOX1*, *JUN*, *NFE2L1*, *NFE2L3*, *SOD2*, *FGR*, *FOS*, *HIF1A*, *NFE2L2*. Среди обнаруженных изменений в экспрессии, наиболее явно была выражена гиперэкспрессия фактора *NFE2L3*. Для анализа регуляторных особенностей транскриптома окислительного статуса, которые позволили бы описать характер наблюдаемых смещений, в данной группе были рассчитаны и проанализированы интерактомно обоснованные соотношения экспрессии компонент про- и антиоксидантной систем, которые позволяют повысить достоверность детекции отличий, для каждого анализируемого образца. В результате этого анализа было выявлено, что в хорионах в группе с дисфункциональным отклонением нарушен контроль экспрессии всех факторов подсемейства Nfe2l - *NFE2L1* (понижение), *NFE2L2* (понижение), *NFE3L3* (повышение). Согласно литературным данным каждое из наблюдаемых нарушений, снижение экспрессии *NFE2L1* и *NFE2L2* и повышение экспрессии *NFE2L3*, в значительной степени негативно влияет на адаптивный потенциал клеток в отношении гипероксии, гипоксии, окислительного, электрофильного и эндоплазматического стрессов.

Применение аналогичного подхода в этой же группе к тканям эндометрия не позволило выявить значимых отличий ни в индивидуальной экспрессии компонентов окислительного статуса, ни в показателях соотношений факторов, что еще раз указывает на вероятно основную роль регуляции генома эмбриональных и экстраэмбриональных тканей в развитии предпосылок дисфункциональных нарушений ранней беременности.

В плацентах при дисфункциональном нарушении беременности третьего триместра выраженные смещения в транскриптом систем окислительного статуса относились к подсистемам *NFE2L1*, *NFE2L2*, *NFE3L3* и *AP1*. Наиболее мощные нарушения экспрессии были характерны для *FOXO1* (снижение в 4 раза), *NFE2L1* (снижение в 3 раза) и *NFE2L3* (повышение в 3 раза).

Таким образом, для поддержания физиологической беременности необходима работа целого ряда защитных каскадов окислительного статуса, что обеспечивается адекватной экспрессией соответствующих генов. Однако и в случаях дисфункциональных нарушений беременности и первого, и третьего триместров нарушается регуляция экспрессии факторов комплексной системы

реактивной защиты NFE2L1, NFE2L2, NFE2L3, AP1, но при двух рассмотренных состояниях эти нарушения имеют разный характер. Так, в группе сравнения 1 (первый триместр) гиперэкспрессируется *NFE2L3*, имеющий выраженное негативное влияние на работу других факторов своего семейства и взаимодействующий с факторами семейств компонент AP1 (Chepelev N.L. et al., 2011). При функциональном отклонении течения беременности третьего триместра изменение экспрессии *NFE2L3* также наблюдается, но не столь выраженное. В то же время наблюдается значительное снижение экспрессии *NFE2L1*, который имеет пересекающиеся с *NFE2L2* роли в контроле экспрессии детоксификационных и антиоксидантных реактивных факторов клетки.

ВЫВОДЫ

1. С помощью разработанной в настоящем исследовании карты интерактома окислительного статуса человека на клеточном уровне, включающей более 390 компонент и более 600 взаимодействий между ними, выявлены несколько положительных и отрицательных контуров про- и антиоксидантной систем и в том числе установлено, что один из наиболее деструктивных положительных контуров прооксидантной системы включает НАДФ•Н-оксидазы, ксантиноксидоредуктазу, мочевую кислоту и гомоцистеин, тогда как функционирование значительной части антиоксидантной системы взаимозависимо с экспрессией редокс-регуляторного белка тиоредоксина 1.

2. Выявлено, что физиологическое течение беременности характеризуется значительным возрастанием быстрой вспышки хемилюминесценции (на 39%) во втором триместре, по сравнению с первым, и выраженным снижением ее (на 34%) к концу беременности, по сравнению со вторым триместром, - до уровней, характерных для середины первого триместра; величины индексов M/50 и M/S достоверно возрастают от первого ко второму триместру на 18% и 13% соответственно, а затем в конце беременности снижаются до значений первого триместра; выраженных изменений величин светосуммы не наблюдается, при этом изменения величин быстрой вспышки и индексов M/50 и M/S в отсутствие изменений светосуммы ХЛ и при снижении к концу беременности стабилизированной ХЛ свидетельствуют об активации прооксидантных систем к середине беременности и одновременном начале роста антиоксидантной емкости крови, позволяющем к концу беременности достичь контроля над прооксидантной системой, в результате чего на уровне организма окислительный стресс не развивается, замыкания высоко деструктивного контура NOX/XDH не происходит.

3. Показано что, при физиологически протекающей беременности значительный вклад в формирование окислительного статуса вносит тиоредоксин 1 и достоверно коррелирует с быстрой вспышкой ($r=+0,29$), светосуммой ($r=+0,26$), стабилизированной ХЛ ($r=+0,27$). Содержание тиоредоксина 1 в крови беременной женщины относительно стабильно в первом и втором триместрах и значимо снижается в конце гестации на 20% и составляет: на сроке 5-8 недель - 2,4-3,3 нг/мл, на сроке 14-25 недель - 2,2-3,2 нг/мл, на сроке 37-41 недель - 1,8-2,3

нг/мл. Роль тиоредоксин-зависимых антиоксидантных каскадов в поддержании окислительного статуса падает в конце гестации.

4. При физиологическом течении беременности не выявлено замыкания деструктивного контура прооксидантной системы, а функционирование контуров антиоксидантной системы характеризуется качественной и количественной динамичностью. При самопроизвольном прерывании беременности на фоне повышения интенсивности быстрой вспышки (на 97%), светосумма повышается на 114%, а стабилизированное свечение - на 120% в отсутствии выраженных изменений индексов M/50 и M/S, что указывает на развитие окислительного стресса по типу дисфункции антиоксидантных систем. При неразвивающейся беременности тиоредоксин 1 имеет сильную положительную корреляцию с индексом M/50 ($r=+0,82$), что характеризует контур положительных обратных связей тиоредоксина 1 как мажорный эффектор функционирования антиоксидантной системы при данном дисфункциональном нарушении гестации. При истмико-цервикальной недостаточности быстрая вспышка ХЛ сыворотки снижена на 35%, светосумма на 65% на фоне снижения содержания тиоредоксина 1 на 14%, и отсутствие его корреляции со стабилизированной ХЛ и светосуммой, что указывает на нарушение функции прооксидативных систем организма, отсутствие гиперактивации антиоксидантной системы. При осложнении гестации третьего триместра не происходит замыкание мощных деструктивных контуров в силу наличия множественных минорно-эффекторных нарушений функционирования клеточных систем.

5. Дисфункциональные нарушения беременности характеризовались специфическими отклонениями в регуляции транскриптома. В тканях плацент при осложнении гестации третьего триместра и хорионов при самопроизвольном аборте значительно повышена экспрессия фактора 3, родственного ядерному эритроидному фактору 2, (NFE2L3) (в 2,9 и в 12,9 раз соответственно). При осложнении беременности третьего триместра также в 2,8 раза снижена экспрессия NFE2L1. При самопроизвольном аборте в тканях хориона нарушена экспрессия генов 10 систем, связанных с обеспечением иммунной функции организма и обеспечивающих пролиферацию и отбор Т-клеток, процессинг и представление антигенов, контроль адгезии и иммунной сигнализации, хемотаксис лейкоцитов. В эндометрии отсутствуют нарушения экспрессии генов, что свидетельствует о первичной роли регуляции генома плода, а не матери, в развитии локальных предпосылок спонтанного аборта.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для систематизации экспериментальных данных в области клеточной биологии окислительного статуса, выявления противоречий в экспериментальных данных, получаемых разными группами или на разных моделях, предсказания существования неизвестных участников регуляторных контуров посредством выявления отличий в поведении исследуемых каскадов в разных моделях, для разработки методов дифференциальной диагностики гетерогенных заболеваний, для изучения патофизиологии и этиологии различных заболеваний, а также для

выбора маркеров для целей фундаментальной клеточной и организменной физиологии и практической биомедицины использовать карту интерактома окислительного статуса человека на клеточном уровне.

2. Использовать в клинической лабораторной диагностике полученные данные о содержании тиоредоксина 1 в плазме крови в процессе беременности для разработки региональных референсных норм содержания данного белка в крови беременных.

3. Учитывать данные, полученные в результате исследования об особенностях работы тиоредоксин 1-зависимых антиоксидантных контуров на разных сроках беременности, при разработке методов терапевтической коррекции нарушений окислительного статуса при дисфункциональных отклонениях гестации.

4. При исследовании общего окислительного статуса в практической медицине использовать расчет индексов M/50 и M/S для создания новых методов оценки функциональной активности антиоксидантных контуров регуляции.

5. Результаты проведенных исследований могут лечь в основу новых исследований в области изучения механизмов гомеостаза окислительного статуса на уровне клетки и организма, этиологии и патофизиологии истмико-цервикальной недостаточности и тяжелого гестоза, разработки методов предиктивной диагностики спонтанных аборт и неразвивающейся беременности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Zolotukhin, P. Oxidative status interactome map: towards novel approaches in experiment planning, data analysis, diagnostics and therapy / P. Zolotukhin, Y. Kozlova, A. Dovzhik, K. Kovalenko [et al.] // *Molecular BioSystems*. – 2013. – No. 8. (9) - P. 2085-2096 (1,0625 п/л, личный вклад 60%).

2. Zolotukhin, P. Oxidative status shifts in uterine cervical incompetence patients / P. Zolotukhin, A. Aleksandrova, A. Goncharova, A. Shestopalov [et al.] // *Systems Biology in Reproductive Medicine*. - 2014. - No. 2. - P. 98-104 (1,09 п/л, личный вклад 50%).

3. Zolotukhin, P. Testing the Concept of the Interatomic Status of the NFE2L2/AP1 Pathway as a Systemic Biomarker for Examination Stress / P.V. Zolotukhin, A.D. Dovzhik, U.A. Lebedeva, O.N. Kuzminova [et al.] // *Molecular Diagnosis and Therapy*. - 2014. - No. 3. - P. 355-369 (1,0625 п/л, личный вклад 45%).

4. Zolotukhin, P.V. The interactive map of NF-kappaB-dependent inflammatory molecular interactions in human / Zolotukhin P.V., Mashkina E.V., Kovalenko K.A. // *European Journal of Human Genetics*. – 2013. - Vol. 21 (Supplement 2). – P. 551. (В журнале опубликованы материалы Европейской Конференции по Генетике Человека (EHGC 2013)) (0,06 п/л, личный вклад 40%).

5. Золотухин, П.В. Положительный контур мочевой кислоты, гомоцистеина, NOX и XOR: нефрологические аспекты / П.В. Золотухин, В.К. Чмыхало, М.С. Макаренко, С.А. Коринфская [и др.] // *Нефрология*. - 2014. - № 5. - в печати (0,84 п/л, личный вклад 48%).

6. Золотухин, П.В. Фактор роста и дифференцировки GDF-15 в сыворотке крови беременных женщин при физиологической и осложненной тяжелым гестозом беременности / Гончарова А.С., Александрова А.А., Гутникова Л.В., Золотухин П.В., Шкурят Т.П. // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6. - URL: www.science-education.ru/113-10811 (0,16 п/л, личный вклад 35%).

7. Zolotukhin, P.V. Ribonucleoprotein compartments of the eukaryotic cell / HybriQ collaboration (групповой автор включает П.В. Золотухина), V.V. Khrenkova, A.A. Aleksandrova // Валеология. - 2013. - №. 4. - С. 19-28 (0,58 п/л, личный вклад 50%).

8. Zolotukhin, P.V. Challenging uterine cervical incompetence molecular pathophysiology / HybriQ collaboration (групповой автор включает П.В. Золотухина), A.A. Aleksandrova, L.V. Gutnikova, A.S. Goncharova [et al.] // Валеология. - 2013. - №. 4. - С. 29-33 (0,39 п/л, личный вклад 50%).

9. Золотухин, П.В. Интерактомика - аналитический инструмент для изучения молекулярных основ нефропатий / П.В. Золотухин, А.А. Александрова, А.Д. Довжик, Ю.А. Лебедева [и др.] // Нефрология. – 2013. – № 5. - С. 9-15 (0,9 п/л, личный вклад 51%).

10. Золотухин, П.В. Исследование окислительного статуса женщин при физиологически протекающей беременности на разных этапах гестации / А.С. Гончарова, А.А. Александрова, П.В. Золотухин, А.Е. Самсонов [и др.] // Валеология. – 2010. – № 4. – С. 19-24 (0,49 п/л, личный вклад 40%).

11. Золотухин, П.В. Окислительный стресс и беременность / П.В. Золотухин // Валеология. – 2010. - № 2. - С. 16-21 (0,49 п/л, личный вклад 100%).

12. Золотухин, П.В. Антимутагенная активность производного пластохинона, адресованного в митохондрии / В.А. Чистяков, М.А. Сазыкина, А.А. Александрова, Н.И. Беличенко, Е.В. Машкина, Л.В. Гутникова, П.В. Золотухин, Т.П. Шкурят // Биохимия. – 2010. – № 3. - С. 331-336 (0,9 п/л, личный вклад 15%).

Работы, опубликованные в других изданиях

13. Zolotukhin, P.V. Assessing the regulation dependencies of thioredoxin 1 transcript variants by means of interactomic dynamic-with-induction profiling approach / A.D. Dovzhik, P.V. Zolotukhin, E.A. Mayboroda, E.V. Mashkina [et al.] // «Живые и биокосные системы». – 2014. – № 6. - URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-6/article-8> (0,35 п/л, личный вклад 60%).

14. Золотухин, П.В. Интерактомная дивергенция тиоредоксин-доменных белков человека / В.К. Чмыхало, Ю.А. Лебедева, О.Н. Кузьминова, А.А. Беланова [и др.] // Материалы 81-й всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Актуальные вопросы современной медицины”. - 2014. - С. 276-277 (0,06 п/л, личный вклад 50%).

15. Золотухин, П.В. Трансляция интерактомики в биомедицинскую практику: Oxidative status interactome map / П.В. Золотухин, Ю.А. Лебедева, О.Н. Кузьминова, А.А. Беланова [и др.] // Материалы III международной конференции "Биотехнология. Взгляд в будущее". - 2014. - С. 82-83 (0,06 п/л, личный вклад 55%).

16. Золотухин, П.В. Интерактивно-ориентированное профилирование транскриптома плацент при тяжелом гестозе / П.В. Золотухин, А.А. Александрова, Е.В. Машкина, И.О. Покудина [и др.] // Материалы I Международного Форума «Молекулярная медицина – новая модель здравоохранения XXI века: технологии, экономика, образование». - 2013. - С. 74-75 (0,06 п/л, личный вклад 52%).

17. Золотухин, П.В. Обращенный метод пирсоновской кластеризации для анализа характеристик экспрессии ARE-зависимых генов / П.В. Золотухин, Ю.А. Лебедева, О.Н. Кузьминова, С.А. Коринфская [и др.] // Материалы V международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», Ростов-на-Дону. - 2013. - С. 26-27 (0,06 п/л, личный вклад 60%).

18. Золотухин, П.В. Показатели контроля качества полногеномного транскриптомного профилирования для детекции вариантов гетерогенных состояний при нарушениях эмбриогенеза / П.В. Золотухин // Материалы 51-й международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». Новосибирск. – 2013. - С. 225 (0,06 п/л, личный вклад 100%).

19. Золотухин, П.В. Прикладная интерактомика окислительного статуса клеток человека / П.В. Золотухин, А.А. Александрова, А.Д. Довжик, К.А. Коваленко [и др.] // Материалы III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань. – 2012. - С. 322-323 (0,06 п/л, личный вклад 48%).

20. Золотухин, П.В. Интенсивность свободнорадикальных процессов и содержание гомоцистеина у женщин с гестозом и их новорожденных / П.В. Золотухин, А.А. Александрова, Е.Г. Деревянчук, А.С. Гончарова [и др.] // Материалы XII Всероссийского научного форума «Мать и дитя», Москва. – 2011. – С. 70-71 (0,06 п/л, личный вклад 45%).

21. Золотухин, П.В. Интенсивность свободнорадикальных процессов и содержание мочевой кислоты у женщин с гестозом и их новорожденных / А.А. Александрова, П.В. Золотухин, А.С. Гончарова, Т.П. Шкурат // Материалы IV международной конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», Ростов-на-Дону. - 2011. – С. 93-94 (0,06 п/л, личный вклад 40%).

22. Золотухин, П.В. Исследование индуцированной хемилюминесценции в сыворотке крови при различных вариантах течения беременности / П.В. Золотухин, В.Н. Прокофьев, А.А. Александрова, Т.П. Шкурат // Материалы III всероссийской научно-практической конференции "Функциональное состояние и здоровье человека". Ростов-на-Дону. – 2010. - С. 143-144 (0,06 п/л, личный вклад 50%).

23. Золотухин, П.В. Интенсивность свободно-радикальных процессов в сыворотке крови беременных / П.В. Золотухин, А.А. Александрова, В.Н. Прокофьев // Материалы II всероссийской научно-практической конференции «Физиология адаптации». Волгоград. – 2010. – С. 204-207 (0,12 п/л, личный вклад 50%).

И др., всего 39 публикаций по теме диссертационного исследования, из них 12 - в журналах из перечня ВАК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИЦН - истмико-цервикальная недостаточность
К1 - группа с физиологическим течением беременности в первом триместре
К2 - группа с физиологическим течением беременности во втором триместре
К3 - группа с физиологическим течением беременности в третьем триместре
СА - самопроизвольный аборт
ХЛ - хемилюминесценция
Akt - RAC-альфа серин/треонин-протеинкиназа
AP1 - активаторный белок 1
GO - база данных или категории Gene Ontology
HGNC - HUGO Gene Nomenclature Committee - комитет номенклатуры генов при
Организации Изучения Генома Человека
МАРК - митоген-активируемая протеинкиназа
NCBI - National Center for Biotechnology Information - национальный центр
биотехнологической информации США
NF- κ B - ядерный фактор каппа В
NFE2L - фактор, родственник ядерному эритроидному фактору 2
Nox - НАДФ•Н-оксидаза
PI3K - фосфотидилинозитол-3-киназа
RIN - индекс целостности РНК
RT-IVT - обратная транскрипция с последующей амплификацией методом *in vitro*-
транскрипции
SAM - пермутационный анализ значимости отличий для микрочипов
TRX-1 - тиоредоксин 1
Wnt - белок Wnt
XDH - ксантиноксидоредуктаза