Биомедицинская химия, 2017 том 63, вып. 2, с. 139-146.

©Коллектив авторов

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ВО ВРЕМЯ ИСПЫТАНИЯ, МОДЕЛИРУЮЩЕГО УСЛОВИЯ ТЕПЛОВОЙ ВОЛНЫ

Е.С. Феоктистова, А.В. Скамров*, Л.Е. Горюнова, Г.Л. Хаспеков, М.К. Осяева, О.В. Родненков, Р.Ш. Бибилашвили

Российский кардиологический научно-производственный комплекс,
121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а; эл. почта: askamrov@yandex.ru

В эксперименте по изучению теплового воздействия на человека смоделированы условия волны тепла июля – августа 2010 г. в Москве. В испытании участвовали 6 практически здоровых добровольцев мужского пола. Анализ экспрессии генов проводили с использованием образцов тотальной РНК, выделенной из крови участников эксперимента. Анализ активности генов с использованием ОТ-ПЦР в реальном времени показал, что ход наблюдаемых изменений экспрессии генов можно описать следующим образом: в результате длительного теплового воздействия происходит сдвиг картины экспрессии набора генов, а после снятия теплового воздействия – восстановление первоначальной картины. Из проанализированной коллекции выбрано 8 генов, формирующих характерный профиль "тепловой экспрессии". При тепловом воздействии для генов *EGR2*, *EGR3* увеличение уровня экспрессии отмечено у всех 6 испытуемых, а для генов *EGR1*, *SIRT1*, *CYP51A1*, *MAPK9*, *BAG5*, *MNDA* – у пяти из 6 испытуемых.

Ключевые слова: волны жары, экспрессия генов

DOI 10.18097/PBMC20176302139

ВВЕДЕНИЕ

Представление о глобальном потеплении возникло как результат многолетних наблюдений метеорологов за среднегодовой температурой Земли. Процесс роста среднегодовой температуры на планете происходит неравномерно: периоды повышения температуры чередуются с периодами, когда среднегодовая температура почти не изменяется. В XX–XXI в. выделяют три периода: рост температуры в 1910–1945 гг., плато (слабое похолодание) – 1946–1976 гг., интенсивное потепление – начиная с 1976 г. Скорость роста температуры неодинакова и в разных точках земного шара. Так, в последний период среднегодовая температура Земли увеличивается на 0,2°С за 10 лет, а на территории России – на 0,4°С за 10 лет. В докладах [1-3] предприняты попытки описания разнообразных последствий изменений климата. В разделе, посвященном влиянию климатических изменений на здоровье людей, отмечается, что прямое воздействие на здоровье связано с изменением температурного режима. Воздействие может быть благоприятным из-за улучшения тепловой комфортности проживания в холодное время года, особенно в северных регионах. С другой стороны, негативные последствия климатических изменений отчетливо проявляются во время участившихся климатических аномалий (волн тепла/холода). Так, во время волны тепла 2010 года произошло резкое увеличение числа случаев смерти [2], а также у миллионов людей возросла уязвимость к простудным и инфекционным заболеваниям, что повысило риск возникновения эпидемий в осенне-зимний сезон 2010–2011 гг. В докладах [1-3] отмечена необходимость изучения факторов риска для здоровья, связанных с изменениями климата, для разработки мер, которые позволяли бы снизить их негативное влияние, а также мер, позволяющих облегчить адаптацию в периоды климатических аномалий. Это особенно актуально в связи с предсказанием того, что в XXI веке волны жары будут наблюдаться чаще, а максимальные значения температуры будут увеличиваться [4]. Так как в настоящее время приближение волн тепла/холода предсказывается достаточно плохо, целесообразно проводить модельные исследования, в которых искусственно воспроизводятся условия, характерные для климатических аномалий. По этическим соображениям в подобные исследования включают здоровых добровольцев.

МЕТОДИКА

Протокол эксперимента был одобрен этическими комитетами Российского кардиологического научно-производственного комплекса и Института медико-биологических проблем РАН (ИМБП). В исследование включили 6 здоровых, физически активных мужчин, проинформированных о целях и методах исследования и давших свое письменное согласие. Каждому участнику эксперимента был присвоен индивидуальный индекс (МК).

Эксперимент по моделированию теплового воздействия проводили на базе медико-технического комплекса ИМБП. Во время проведения испытания 6 практически здоровых добровольцев мужского пола в возрасте 22–46 лет (медиана – 35 лет) проживали в изолированном модуле в течение 30 дней. Модуль позволяет воспроизвести любые климатические условия в жилой зоне.

Во время испытания были смоделированы условия волны тепла июля – августа 2010 г. в Москве:

* - адресат для переписки

температура в жилой зоне днём – 30–38°С при влажности 30–60%; температура в ночное время составляла 23–31°С при влажности 50–75%. Протокол испытания включал адаптационный период (1–3 день испытания), в течение которого температура в модуле постепенно повышалась. Более подробный протокол испытания, а также результаты изучения параметров микроциркуляторного кровотока в коже человека в условиях длительного теплового стресса приведены ранее [6].

Образцы крови отбирали перед началом испытания, на 3-й и 12-й день пребывания в модуле и через 3 дня после окончания испытания.

Для выделения РНК 18 мл венозной крови забирали в пробирки Vacuette (“Greiner Bio-One”, Австрия), содержащие 3,8%-й раствор цитрата натрия. Форменные элементы осаждали центрифугированием 300 *g* 30 мин (1400 об/мин, TJ-6, “Beckman”, США). Плазму отбрасывали, оставляя в пробирке 5 мл жидкости. Форменные элементы ресуспендировали и добавляли 45 мл лизирующего эритроциты буфера (155 мМ хлорид аммония, 10 мМ $KHCO_3$, 1 мМ ЭДТА). Смесь инкубировали во льду в течение 10 мин с периодическим встряхиванием. Лейкоциты осаждали центрифугированием (300 *g*, 15 мин). Процедуру повторяли с добавлением 25 мл лизирующего буфера. Осадок ресуспендировали в 20 мл раствора фосфатно-солевого буфера Дульбекко (PBS), содержащего 0,1 мМ ЭДТА, и собирали центрифугированием (300 *g*, 15 мин). Осадок ресуспендировали в 1 мл того же раствора, переносили в пробирки объёмом 2 мл, собирали центрифугированием 300 *g* в течение 2 мин (2000 об/мин, Eppendorf 5415C, “Eppendorf”, США). Супернатант удаляли, а осадок замораживали в жидком азоте и хранили при -70°С до выделения РНК.

Выделение суммарной РНК из лейкоцитов периферической крови человека

К каждому образцу лейкоцитарного осадка добавляли по 400 мкл 1-кратного денатурирующего буфера (2,7 М гуанидин тиоцианат, 1,3 М аммония тиоцианат, 100 мМ натрия ацетат, pH 4,0, 5 мМ ЭДТА; 0,8% β-меркаптоэтанол). Образец гомогенизировали максимально быстро с помощью гомогенизатора Ultraturrax T25 (“Kika Labortechnik, Janke & Kunkel”, Германия).

Немедленно к гомогенату добавляли 950 мкл подкисленной фенольной смеси (фенол 60%, глицерин 8%, 100 мМ натрия ацетат, pH 4,0) и интенсивно встряхивали в течение минуты, центрифугировали 1 мин, 20000 *g*, +4°С (14000 об/мин, Eppendorf 5810R). К образцам добавляли по 300 мкл хлороформа, пробирки интенсивно встряхивали в течение 1–2 мин, инкубировали 10 мин во льду, центрифугировали 15 мин, 20000 *g*, +4°С, торможение медленное.

Верхнюю фазу переносили в новые пробирки, добавляли равный объём изопропанола, интенсивно встряхивали и инкубировали во льду 10 мин, центрифугировали 30 мин, 20000 *g*, +4°С, торможение медленное. Осадки отмывали два раза 1 мл 80% этанола с центрифугированием в течение 5 мин, 20000 *g*, +4°С, торможение медленное.

Осадки растворяли в 120 мкл деионизованной воды. К образцам добавляли 1,2 мкл ингибитора РНКаз (6 мг/мл, “Техноген”, Россия), 13,5 мкл 10-кратного ДНКазного буфера (0,2 М Трис-HCl, 0,1 М $MgCl_2$, 5 мМ $CaCl_2$), 1 мкл ДНКазы I (10000 ед/мл DNase I, RNase-free, “Roche Diagnostics Corporation”, США) и 0,5 мкл экзонуклеазы I (20000 ед/мл Exo I, “New England BioLabs”, США). Образцы инкубировали 20 мин при 37°С.

К образцам добавляли 265 мкл 1,5-кратного денатурирующего буфера, 950 мкл подкисленной фенольной смеси, 300 мкл хлороформа и центрифугировали 15 мин, 20000 *g*, +4°С, торможение медленное. Верхнюю фазу отбирали, РНК осаждали изопропанолом и промывали 80% этанолом как описано выше.

Концентрацию суммарной РНК определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм. Целостность РНК оценивали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле по соотношению интенсивностей полос, соответствующих 28S и 18S рРНК. Во всех полученных образцах это соотношение больше единицы. Степень загрязненности образцов суммарной РНК геномной ДНК оценивали методом ПЦР с использованием праймеров к HLA-антигену I класса, локусу C. В исследованных образцах примесь геномной ДНК составляла не более 0,01%.

Выход суммарной РНК составлял 1,3–3 мкг/мл венозной крови (среднее значение 2,2 мкг).

Синтез кДНК

кДНК была синтезирована из 2 мкг предварительно денатурированной (70°С, 5 мин) суммарной РНК в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ Трис-HCl (pH 8,3), 75 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$, 2.5 мкМ девятинуклеотидных праймеров (“Синтол”, Россия), 1 мМ дНТФ (каждый из дезоксинуклеозидтрифосфатов) (“Qiagen”, Германия), 10 мМ дитиотрейтол, 200 единиц обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей Молони (MMLV) (“Promega”, США). Реакцию проводили в течение 60 мин при температуре 37°С и останавливали добавлением 180 мкл буфера А, содержащего 5 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА.

ПЦР в реальном времени

Праймеры для ПЦР выбирали с использованием программы Primer3 из пакета UniproUgene (последовательности нуклеотидов праймеров доступны у авторов по запросу). Олигонуклеотиды синтезированы в компании “Евроген” (Россия).

ПЦР-анализ проводили на приборе StepOnePlus (“Applied Biosystems”, США) в реакционной смеси объёмом 20 мкл, содержащей буферную смесь (16 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 67 мМ Трис HCl (pH 8,8 при 25°С), 1,5 мМ $MgCl_2$), дНТФ (0,2 мМ каждого), Taq-полимеразу фирмы “Евроген” 0,05 ед/мкл. Для “горячего старта” использовали антитела к Taq-полимеразе TaqStart (ООО “МонА”, Россия).

В реакционную смесь вносили 1 мкл кДНК, приготовленной как описано выше.

Данные нормировали с использованием в качестве референсного гена домашнего хозяйства, кодирующего U6 snRNA.

При SYBR Green I детекции накопления ампликона добавляли два праймера до концентрации 1 мкМ (каждого) и SYBR Green I 1x ("ДНК-Синтез", Россия). По окончании амплификации во всех образцах снимались кривые плавления.

Мерой количества РНК гена в опытах ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием SYBR Green I детекции были выбраны значениях порогового цикла (C_t). Измерение уровня экспрессии каждого гена во всех анализируемых образцах проводили в рамках одного ПЦР-опыта. Это дало возможность сравнивать значения пороговых циклов напрямую без стадии пересчёта с привлечением калибровочной кривой, что позволило уменьшить ошибки измерения.

Кластерный анализ проводили с использованием программ Cluster и TreeView [5].

Перед началом процедуры кластеризации проводили контроль качества данных. На первом этапе исключали гены, у которых среднее значение порогового цикла по всем анализируемым образцам оказывалось больше 28. Такие значения пороговых циклов свидетельствуют о малом числе молекул-мишеней в анализируемых образцах, что приводит к большим ошибкам измерения.

На втором этапе для каждого гена и каждой временно́й точки анализировали значения C_t в рамках одного ПЦР-опыта (набор данных от всех испытуемых). Для этого находили медиану значений пороговых циклов и вычисляли отклонения каждого значения от медианы. Если какое-то отклонение оказывалось больше 1,5 циклов, то ПЦР-анализ и процедуру вычислений повторяли. При воспроизведении больших отклонений данные отправлялись в дальнейший анализ без внесения изменений. Если в результате повторного опыта соответствующее отклонение оказывалось меньше 1,5 циклов, то пороговый цикл, показавший большое отклонение, приобретал статус "не прошедший контроль качества данных". Его значение при дальнейшем анализе заменяли на описанную выше медиану.

При кластерном анализе результаты повторяющихся опытов по измерению уровня экспрессии одного и того же гена учитывались независимо (без усреднения, см. рис. 1). В качестве меры различия использовалось манхэттенское расстояние. Для оценки статистической достоверности результатов анализа использовали программы из среды программного обеспечения R.

При TaqMan ПЦР добавляли амплификационные праймеры до концентрации 0,3 мкМ (каждого). Зонд (FAM-BHQ1, "Синтол") добавляли до концентрации 0,25 мкМ.

В опытах ОТ-ПЦР в реальном времени с применением TaqMan детекции количественную оценку получали с использованием калибровочной кривой (зависимости порогового цикла от логарифма концентрации стандарта). Для приготовления стандартного образца смешивали РНК, полученную из крови здоровых индивидуумов. Реакцию обратной транскрипции проводили как описано выше. При остановке реакции к реакционной смеси добавляли 80 мкл буфера А, так что концентрация кДНК в стандартном образце оказывалась примерно в 2 раза выше, чем в рабочих образцах. Для каждого анализируемого гена при построении калибровочной кривой пороговому циклу в стандартном образце кДНК приписывалось значение 2. Дополнительные точки калибровочной кривой получали разведением стандартной кДНК перед ПЦР-анализом с шагом 3. Перевод значений порогового цикла в количество кДНК с применением описанной метрики проводили с использованием программного обеспечения прибора StepOnePlus ("Applied Biosystems").

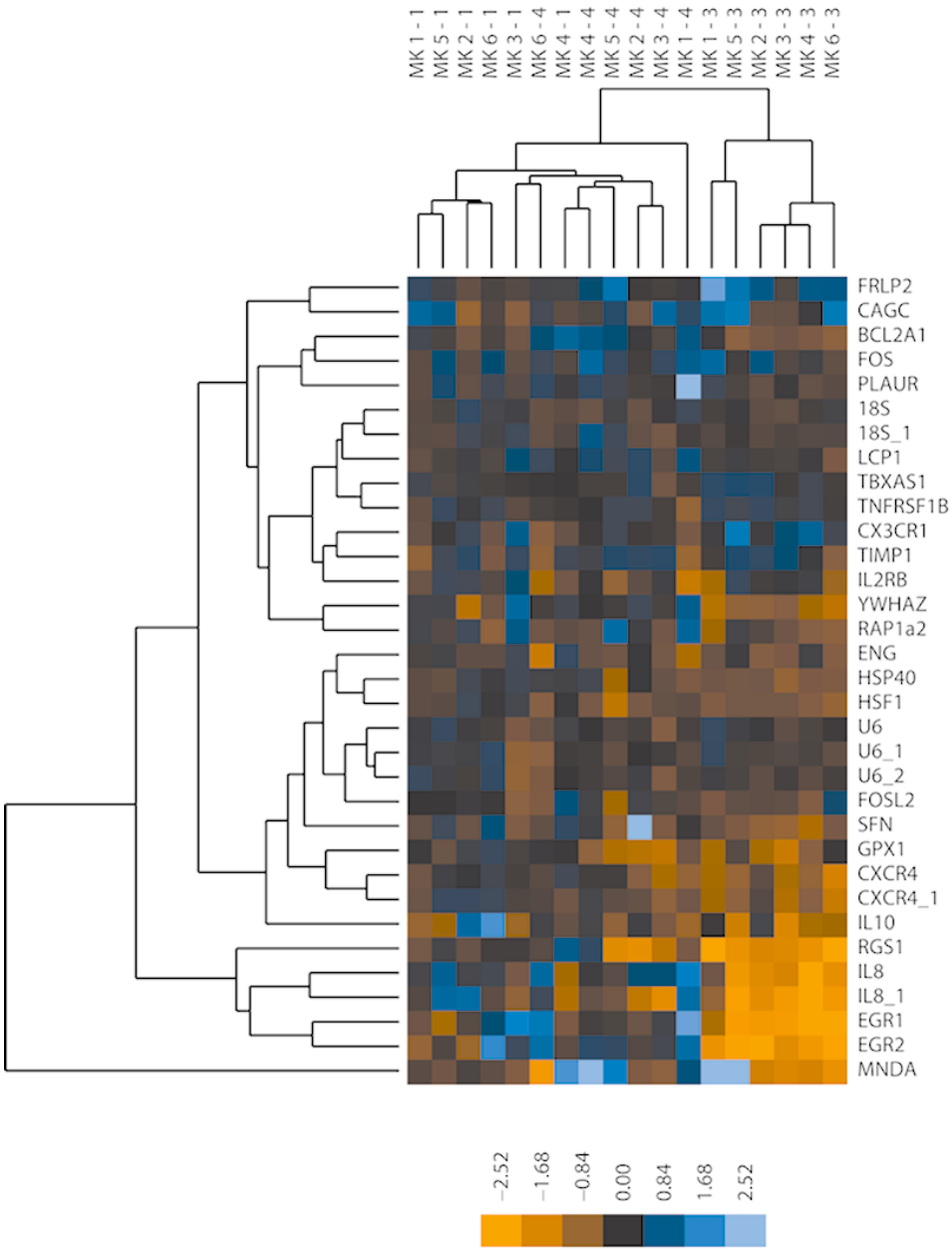
РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ экспрессии генов проводили с использованием образцов тотальной РНК, выделенной из крови участников исследования перед началом испытания (временна́я точка 1), на 3-й день пребывания в модуле (временна́я точка 2 – окончание адаптационного периода), на 12-й день пребывания в модуле (точка 3) и через 3 дня после окончания испытания (точка 4).

Во всех образцах определяли уровень экспрессии 100 генов (табл. 1). Выбор генов для анализа был основан на результатах выполненных ранее работ, в которых сравнивались уровни экспрессии генов в лейкоцитах крови у здоровых и больных различными сердечно-сосудистыми заболеваниями индивидуумов [7-9]. В список попали гены с измененным при патологии уровнем экспрессии. Полученный набор дополнен генами, которые по данным других исследователей изменяют активность при разного рода стрессовых воздействиях на организм. Список проанализирован с помощью интернет-ресурса PANTHER [10]. В таблице 1 приведена классификация по биологическим функциям продуктов генов с использованием терминов GO (Генная онтология) [11]. Как видно из таблицы 1, выбранные для анализа гены вовлечены в самые разнообразные процессы на уровне клетки и целого организма.

Уровень экспрессии генов определяли с использованием метода ОТ-ПЦР в реальном времени как описано в разделе "Методика". Мы не обнаружили разницы в уровнях экспрессии всех проанализированных генов между образцами, полученными до начала (временна́я точка 1) и по окончании адаптационного периода (временна́я точка 2).

Визуальное представление общей картины результатов измерений и их анализа приведено на рисунке 1 (расширенная версия рисунка приведена в приложении к статье). При рассмотрении топологии дендрограммы выделяются две самые глубокие ветви: одна сформировалась из временных точек 1 и 4, а вторая – из точки 3, то есть ход наблюдаемых



Примечание. Отрицательным числам соответствует увеличение активности гена, положительным — уменьшение.

Рисунок 1. Кластерный анализ результатов изменения уровня экспрессии генов при тепловом воздействии. Данные получены ОТ-ПЦР в реальном времени с применением SYBR Green I. Уровни экспрессии генов измерялись в значениях порогового цикла (C_t, раздел “Методика”).

изменений можно описать следующим образом: в результате длительного теплового воздействия происходит сдвиг картины экспрессии определённого набора генов, а по окончании – восстановление первоначальной картины. Примечательно, что бутстреп анализ [12] показал высокую устойчивость кластеров из временных точек 1 и 4 (96%, n = 1000) и 3 (94%, n = 1000). Однако, следует отметить, что большинство проанализированных генов оказались неинформативными (либо из-за отсутствия изменений в уровне экспрессии при проведении испытания, либо из-за высокой вариабельности активности генов у индивидуумов).

Активность восьми генов (*EGR1*, *EGR2*, *EGR3*, *SIRT1*, *CYP51A1*, *MAPK9*, *BAG5*, *MNDA*), показавших максимальное увеличение экспрессии на 12 день испытания, была охарактеризована более детально: уровень экспрессии был дополнительно измерен с использованием TaqMan ПЦР. Применение варианта TaqMan ПЦР в реальном времени позволяет повысить точность измерения количества ампликона (по сравнению с SYBR Green I вариантом). Результаты приведены на рисунке 2. Видно, что при длительном тепловом воздействии в клетках крови испытуемых возрастает активность генов, а при снятии теплового воздействия – уменьшается.

Таблица 1. Список генов для анализа экспрессии на уровне РНК в лейкоцитах крови человека при проведении испытания

Классификационные термины GO	**Гены**
Клеточная адгезия (cell adhesion; GO0007155)	*ITGB2, ITGAL, ITGB3, RAP1a, ITGB1, CD36, CTNNA1, ITGAX*
Клеточный компонент организации или биогенеза (cellular component organization or biogenesis; GO0071840)	*PINK1, APOE, SIRT1, BCL2A1, LCP1, CTNNA1*
Клеточный процесс (cellular process; GO0009987)	*TNFRSF10B, TRAF2, ITGB2, YWHAZ, TNFRSF10A, TGFb, CAGC, TRAF2, PPARg, ITGB3, PINK1, F5, DUSP6, APOE, BAG5, SIRT1, RAP1a, SFN, ZFP36, ITGB1, BCL2A1, CASP4, TNFSF10, JUN, IGFBP2, SPP1, CD36, CD79A, BAG4, HRC, PTEN, TNFRSF1B, RGS19, JAK3, IFIT3, CASP2, LCP1, CTNNA1, RGS1, CD163, CD3E, IL2RB, IL8, SFN, ENG, PDPK1, APP, PRKAA1, MAPK9, DUSP1, CD4, TNFRSF1A, TIMP1, GJA4, PARK7, RGS2*
Развитие (developmental process; GO0032502)	*TNFRSF10B, TRAF2, TNFRSF10A, TGFb, PINK1, DUSP6, APOE, BCL2A1, CASP4, TNFSF10, JUN, SPP1, DUSP2, CD79A, TNFRSF1B, RGS19, JAK3, CASP2, COL18A1, IL2RB, CD274, DUSP1, CD4, TNFRSF1A, ADAM10*
Рост (growth; GO0040007)	*DUSP6*
Процесс, протекающий в иммунной системе (immune system process; GO0002376)	*TNFRSF10B, TRAF2, TNFRSF10A, GPX1, TNFSF10, HSPB1, CD36, FPR3, CD79A, TNFRSF1B, HSP90a, JAK3, IFIT3, COL18A1, IL2RB, IL8, IL2RA, CD4, TNFRSF1A*
Ответ на стимул (response to stimulus; GO0050896)	*F5, DUSP6, MNDA, APOE, ITGB1, BCL2A1, IFI16, PLAUR, CASP4, TNFSF10, HSPB1, JUN, IGFBP2, HRC, TNFRSF1B, RGS19, HSP90a, JAK3, IFIT3, CD3E, IL8, PDPK1, CD99, IL2RA, PRKAA1, CD4, TNFRSF1A, TIMP1, PARK7*
Воспроизводство (reproduction; GO0000003)	*ADAM10*
Процесс, протекающий на уровне многоклеточного организма (multicellular organismal process; GO0032501)	*TNFRSF10B, TNFRSF10A, PPARg, APOE, RAP1a, HSPB1, DUSP2, CD79A, HRC, TNFRSF1B, JAK3, COL18A1, DUSP1, TNFRSF1A, ADAM10*
Метаболический процесс (metabolic process; GO0008152)	*TGFb, CAGC, TRAF2, PPARg, GPX1, YY1, PINK1, F5, MNDA, ZFP36, APOE, SIRT1, ZFP36, IFI16, HSPB1, JUN, SPP1, PTEN, NSDHL, RGS19, HSP90a, JAK3, CYP51A1, RGS1, CD163, SFN, PDPK1, PRKAA1, TIMP1, IDS, PARK7, RGS2*
Локомоция (locomotion; GO0040011)	*JAK3, IL8*
Локализация (localization; GO0051179)	*F5, APOE, RAP1a, RGS19, JAK3, CD163, IL8, CD99, APP*
Неклассифицированный (unclassified)	*ALDH1A3, GP9, ITGA4, FOS, TRADD, FN1, CD14, RPS3A, FADD, PECAM1, ALDH1B1, IL32, SELL, CXCR4, EGR3, IFI44, TBXAS1, IFI6, CX3CR1, SOD2, FOSL2, EGR2, AIM2, EGR1*

Примечание. Классификация генов по биологическим процессам и путям выполнена с помощью интернет-ресурса PANTHER. Приведены идентификационные номера Gene Ontology (GO).

Из рисунка 2 следует, что картина изменений активности выбранных генов отличается внутри группы испытуемых. У 5-го испытуемого (МК5, см. рис. 2) наблюдается повышенная экспрессия генов *EGR1*, *EGR2*, *EGR3* при сохранившейся активности остальных 5-ти генов.

В третьей временно́й точке у МК2 не увеличивается экспрессия гена *EGR1*. Однако, следует отметить повышенную (по сравнению с другими испытуемыми) активность *EGR1* в первой временно́й точке.

Активация всех генов, формирующих профиль “тепловой экспрессии”, наблюдается у МК1, МК3 и МК4.

В качестве примера гена, не показавшего направленных и значимых изменений экспрессии у участников эксперимента в процессе испытания, на рисунке 2 показаны результаты измерения активности *ITGAX*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Пребывание человека при повышенной температуре окружающей среды вызывает физиологический и поведенческий ответ, направленный на поддержание нормальной температуры тела. При действии высокой температуры воздуха наблюдаются физиологические изменения во многих системах организма: сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной и др. Различные аспекты адаптации к высокой температуре подробно освещаются в обзоре [13].

Общепризнанно, что пребывание человека при повышенной температуре окружающей среды

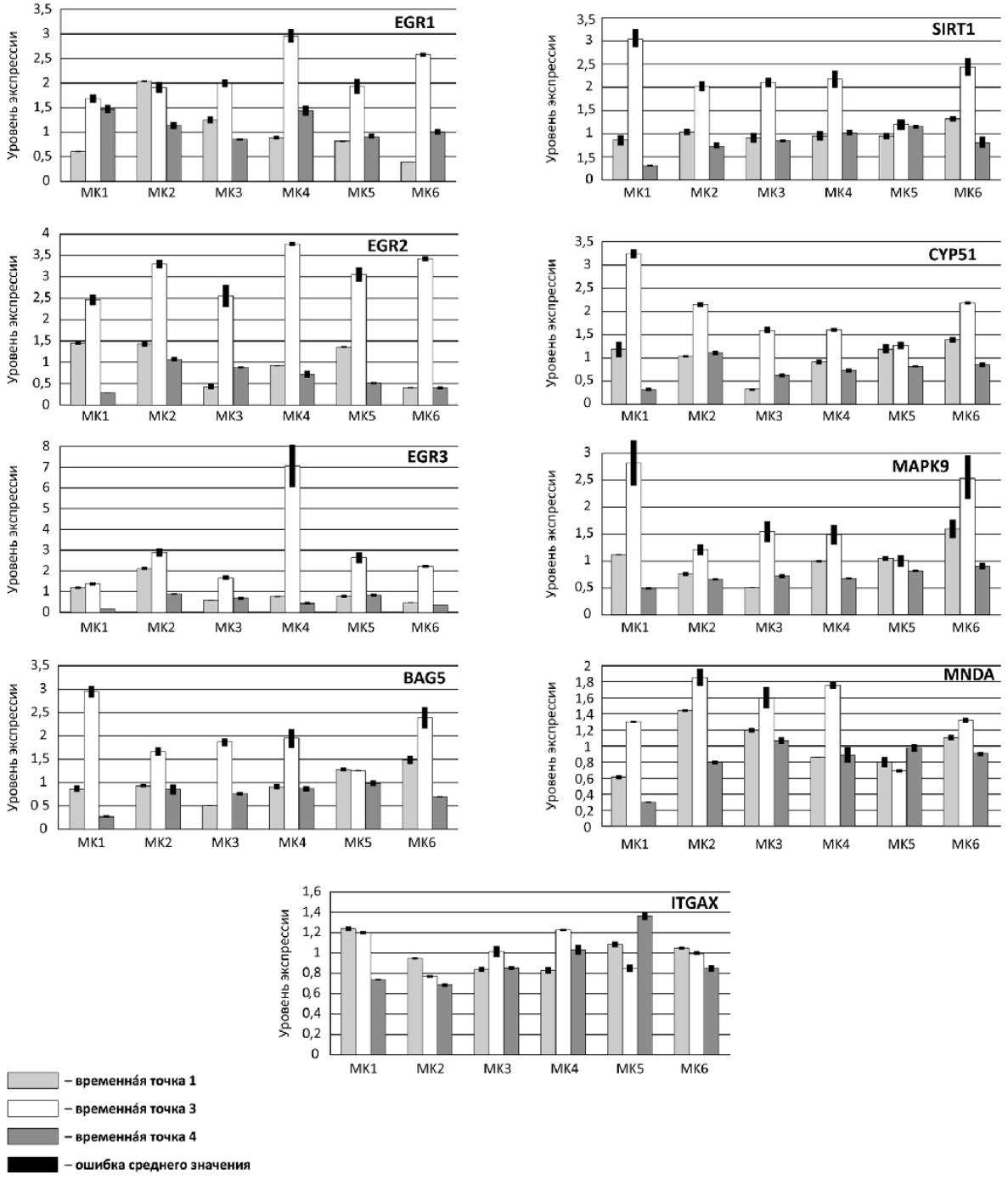


Рисунок 2. Изменение уровня экспрессии генов при тепловом воздействии. Приведены результаты измерений с использованием ОТ-ПЦР в реальном времени (вариант TaqMan). Уровни экспрессии генов выражены в условных единицах, как описано в разделе “Методика”. МК1 - МК6 - индексы испытуемых.

приводит к повышенным нагрузкам на сердечно-сосудистую систему [13, 14]. Ранее при анализе картины экспрессии генов у пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями в нашей лаборатории была выявлена группа генов с изменённым уровнем экспрессии в лейкоцитах крови по сравнению со здоровыми людьми [7-9]. Нам представлялось интересным охарактеризовать активность этих генов у здоровых людей при воздействии, моделирующем волну тепла. Испытание проводили с использованием “пассивного” протокола. Как правило, в ранее выполненных исследованиях, посвященных адаптации спортсменов, военнослужащих и др. к высоким температурам, тепловое воздействие дополняли активными физическими нагрузками (“активный” протокол). При этом о результатах адаптации судят по изменениям таких параметров, как температура тела и частота сердечных сокращений во время и/или после тренировок [13]. В проведённом эксперименте активных физических нагрузок не было, и во время пребывания добровольцев в испытательном модуле значимых изменений температуры тела, а также увеличения частоты сердечных сокращений не зафиксировано [6].

Считается, что при тепловом стрессе нагрузка на сердечно-сосудистую систему и ответная реакция проявляются через короткое время (минуты) [13, 14]. По нашим наблюдениям активность анализируемых генов в лейкоцитах крови на 3 день пребывания в модуле не изменялась.

Длительное пребывание (и тренировки) человека при повышенной температуре приводит к развитию акклиматизации [13]. Наблюдаемая нами на 12 день пребывания в модуле картина экспрессии отличалась от исходной у всех испытуемых, что позволяет связать изменения с процессом акклиматизации. Примечательно, что при снятии теплового воздействия происходит восстановление первоначальной картины экспрессии. Считается, что процесс акклиматизации многостадийный. Число стадий и их продолжительность по мнению разных авторов отличаются. Адаптивные изменения, приобретаемые на ранней стадии (продолжительностью 0,5–2 недели, кратковременная акклиматизация), быстро теряются при снятии стресса [13, 15]. Таким образом, описанный ход изменений экспрессии генов характерен для кратковременной акклиматизации.

Анализу подвергались те гены, активность которых у пациентов с тяжёлыми формами сердечно-сосудистых заболеваний отличается от таковой у здоровых добровольцев. Всего проанализировано около 100 генов. Активность восьми генов (*EGR1*, *EGR2*, *EGR3*, *SIRT1*, *CYP51A1*, *MAPK9*, *BAG5*, *MNDA*), показавших максимальное увеличение экспрессии на 12 день испытания, была охарактеризована более детально. По современным представлениям, эти гены не являются звеньями одной регуляторной цепи, а их продукты выполняют разные функции в клетке (табл. 2): регуляция и модуляция транскрипции (*EGR1*, *EGR2*, *EGR3*, *SIRT1*, *MNDA*), передача сигнала (*MAPK9*, *SIRT1*), регуляция апоптоза и дифференцировки клеток (*MNDA*, *BAG5*, *EGR1*, *EGR2*, *EGR3*, *MAPK9*), участие в метаболизме (*CYP51A1*).

В ранее проведенных исследованиях установлено, что процесс адаптации к повышенной температуре окружающей среды протекает неодинаково у разных людей (зависит от индивидуальных особенностей организма и, в том числе, от истории предыдущих акклиматизаций). Более того, предполагается, что акклиматизация может протекать по более чем одному механизму [13]. Активация только трёх генов (*EGR1*, *EGR2*, *EGR3*) из восьми у одного из участников испытания может быть связана с индивидуальными особенностями прохождения акклиматизации. Это может быть связано как с разной скоростью прохождения стадий, так и с разными механизмами акклиматизации. Увеличение количества временных точек при проведении эксперимента может позволить прояснить картину.

В исследовании, посвящённом поиску экспрессионных маркеров хронической сердечной недостаточности в мононуклеарных клетках крови, показано, что повышенная экспрессия генов *EGR1*, *EGR2*, *EGR3* характерна для больных [16]. Примечательно, что в нашем эксперименте активация генов *EGR2*, *EGR3* наблюдается у всех участников эксперимента, а *EGR1* – у пяти участников (следует отметить первоначально повышенный уровень экспрессии гена *EGR1* у шестого испытуемого по сравнению с остальными участниками, МК2, рис. 2). Для выяснения вопроса о том, связано ли повышение активности генов *EGR1*, *EGR2*, *EGR3* в клетках крови с увеличенными нагрузками на сердце при жаре, необходимо провести дополнительные исследования.

В результате проведенного эксперимента мы выяснили, что при длительном тепловом воздействии происходит сдвиг картины экспрессии генов в лейкоцитах крови человека, при снятии теплового воздействия – восстановление первоначальной картины. Из проанализированной панели выбрано 8 генов, формирующих характерный профиль “тепловой экспрессии”. Одновременная активация комбинации этих генов ранее не описывалась. При тепловом воздействии для генов *EGR2*, *EGR3* увеличение уровня экспрессии наблюдалось у всех 6 испытуемых, а для генов *EGR1, MAPK9, BAG5, MNDA, SIRT1*, *CYP51A1* – у пяти из 6 испытуемых. Показана возможность индивидуальных особенностей адаптации к тепловому воздействию.

Настоящее исследование имеет ограничения: необходимо увеличить число временных точек, а также для строгого статистического анализа – число испытуемых (с учётом наличия индивидуальной реакции на тепловое воздействие).

Таблица 2. Гены, формирующие профиль “тепловой экспрессии”

Ген	Кодируемый белок	Функция
SIRT1	NAD^+-зависимая гистондеацетилаза	деацетилирует лизиновые остатки как в гистонах, так и негистоновых белках
CYP51	ланостерол-14-деметилаза	синтез холестерина, принадлежит суперсемейству цитохромов Р450
EGR1	белок раннего ответа	регулятор транскрипции
EGR2	белок раннего ответа	регулятор транскрипции
EGR3	белок раннего ответа	регулятор транскрипции
MAPK9	митоген-активируемая киназа	передача сигнала
BAG5	Bcl2 ассоциированный ингибитор апоптоза	регуляция апоптоза
MNDA	дифференцировочный ядерный антиген миелоидных клеток	ответ на интерферон в клетках крови

ЛИТЕРАТУРА

1. *Научно-координационный комитет по подготовке "Оценочного доклада об изменениях климата и их последствиях на территории Российской Федерации"* (2008) Оценочный доклад об изменениях климата и их последствиях на территории Российской Федерации. ISBN 978-5-904206-01-7.
2. *Научно-координационный комитет по подготовке "Второго оценочного доклада Росгидромета об изменениях климата и их последствиях на территории Российской Федерации"* (2014) Второй оценочный доклад Росгидромета об изменениях климата и их последствиях на территории Российской Федерации. ISBN 978-5-904206-13-0.
3. *Росгидромет* (2015) Доклад об особенностях климата на территории Российской Федерации за 2014 год. **1**, 1-107. ISBN 978-5-906099-58-7.
4. *Meehl G.A., Tebaldi C.* (2004) Science, **305**, 994-997.
5. *Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O., Botstein D.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 14863-14868.
6. *Федорович А.А., Родненков О.В., Агеева Н.В., Осяева М.К.* (2013) Кардиологический вестник, **VIII**, 7-17.
7. *Timofeeva A.V., Goryunova L.E., Khaspekov G.L., Kovalevskii D.A., Scamrov A.V., Bulkina O.S., Karpov Yu.A., Talitski K.A., Buza V.V., Britareva V.V., Beabealashvilli R.Sh.* (2006) Ann. N.Y. Acad. Sci., **1091**, 319-335.
8. *Samoilov A., Goryunova L.E., Khaspekov G.L., Feoktistova E.S., Skamrov A.V., Lukyanov M.M., Boitsov S.A., Beabealashvilli R.Sh.* (2013) FEBS J, **280**, S279. DOI:10.1111/febs.12340.
9. *Тимофеева А.В., Горюнова Л.Е., Хаспеков Г.Л., Ильинская О.П., Сироткин В.Н., Андреева Е.Р., Тарарак Э.М., Булкина О.С., Буза В.В., Бритарева В.В., Карпов Ю.А., Бибилашвили Р.Ш.* (2009) Кардиология, №9, 27-38.
10. *Mi H., Poudel S., Muruganujan A., Casagrande J.T., Thomas P.D.* (2015) Nucleic Acids Res., **44**, D336–D342.
11. *Mi H., Muruganujan A., Casagrande J.T., Thomas P.D.* (2013) Nature Protocols, **8**, 1551-1566.
12. *Efron B.* (1979) The Annals of Statistics, **7**, 1-26.
13. *Taylor N.A.S* (2014) Comprehensive Physiology, **4**, 325-365.
14. *Périard J.D., Travers G.J.S., Racinais S., Sawka M.N.* (2016) Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical **196**, 52-62.
15. *Périard J.D., Racinais S., Sawka M.N.* (2015) Scand. J. Med. Sci. Sports, **25**, 20-38.
16. *Cappuzzello C., Napolitano M., Arcelli D., Melillo G., Melchionna R., Di Vito L., Carlini D., Silvestri L., Brugaletta S., Liuzzo G., Crea F., Capogrossi M.C.* (2015) Physiol. Genomics, **38**, 233-240.

Поступила: 31. 10. 2016.
Принята к печати: 14. 03. 2017.

ANALYSIS OF GENE EXPRESSION PATTERN IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES DURING EXPERIMENTAL HEAT WAVE

E.S. Feoktistova, A.V. Skamrov, L.E. Goryunova, G.L. Khaspekov, M.K. Osyaeva, O.V. Rodnenkov, R.Sh. Beabealashvilli

Cardiology Scientific and Production Complex,
15a, 3-rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552 Russia; e-mail: askamrov@yandex.ru

The conditions of Moscow 2010 summer heat wave were simulated in an accommodation module. Six healthy men aged from 22 to 46 years stayed in the module for 30 days. Measurements of gene expression in peripheral blood leukocytes before, during and 3 day after simulated heat wave were performed using qRT-PCR. We observed a shift in the expression level of certain genes after heat exposure for a long time, and rapid return to the initial level, when volunteers leaved the accommodation module. Eight genes were chosen to form the "heat expression signature". *EGR2*, *EGR3* were upregulated in all six volunteers, *EGR1*, *SIRT1*, *CYP51A1*, *MAPK9*, *BAG5*, *MNDA* were upregulated in 5 volunteers.

Key words: heat wave, gene expression level