

УДК 616-008.853.2-092.4:577.152.1.085

РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ В РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ КАСПАЗЫ-3 В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ *IN VITRO*

Носарева О.Л.¹, Степовая Е.А.¹, Рязанцева Н.В.^{2,3}, Шахристова Е.В.¹, Веснина О.Н.¹, Новицкий В.В.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Сибирский федеральный университет, г. Красноярск

³ Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск

РЕЗЮМЕ

В основе патогенеза многих распространенных и социально-значимых заболеваний лежит формирование окислительного стресса. Лимфоциты крови являются клетками, обеспечивающими иммунологический контроль организма. В результате происходит контакт лимфоцитов крови с различными эндогенными и экзогенными факторами, что может приводить к интенсификации продукции активных форм кислорода, окислительной модификации макромолекул и изменению выживаемости клеток. Актуальным является расширение и углубление фундаментальных знаний об особенностях регуляции апоптоза лимфоцитов крови.

Цель исследования – установить взаимосвязь между изменением состояния системы глутатиона, уровнем карбонилирования, глутатионилирования белков и активностью каспазы-3 в лимфоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro*.

Материал и методы. Материалом для исследования служили лимфоциты крови, культивированные с добавлением пероксида водорода в конечной концентрации 0,5 ммоль и (или) блокатора SH-групп протеинов N-этилmaleимида – 5 ммоль, протектора – 5 ммоль – 1,4-дитиоэритритола.

Методом спектрофотометрии определяли концентрацию восстановленного, окисленного и белково-связанного глутатиона, дополнительно рассчитывали величину соотношения восстановленной фракции тиола к окисленной. С помощью иммуно-ферментного анализа оценивали уровень карбонильных производных протеинов, активность каспазы-3 регистрировали спектрофлюориметрическим методом.

Результаты. Блокирование SH-групп протеинов в лимфоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* сопровождалось резким падением концентрации белково-связанного глутатиона на фоне увеличения содержания карбонильных производных белков и активности каспазы-3. Протекция SH-групп белков в лимфоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* сопровождалась возрастанием концентрации белково-связанного глутатиона, карбонильных производных протеинов при сопоставимых значениях активности изучаемого фермента.

Выводы. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что каспаза-3 и белково-связанный глутатион являются молекулярными мишенями селективного управления программированной клеточной гибелью.

Полученные показатели изменения активности каспазы-3 и концентрации белково-связанного глутатиона в лимфоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* могут быть использованы при разработке подходов таргетной терапии заболеваний, сопровождающихся дисрегуляцией апоптоза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лимфоциты крови, окислительный стресс, система глутатиона, редокс-статус клетки, окислительная модификация белков, каспаза-3.

Введение

Лимфоциты крови являются важным и неотъемлемым компонентом системы гомеостаза организма че-

ловека. На сегодняшний день установлено, что многие заболевания, связанные с вовлечением лимфоцитов крови в патологический процесс, сопровождаются наработкой активных форм кислорода (АФК), нарушением редокс-баланса клетки с последующим развитием окислительного стресса и дисрегуляцией апоптоза. Контакт лимфоцитов крови с другими клетками и

✉ Носарева Ольга Леонидовна, тел. 8-923-411-19-51;
e-mail: olnosareva@yandex.ru

тканями организма, а также с различными эндогенными и экзогенными факторами может приводить к интенсификации продукции АФК, которые могут выступать в роли повреждающих агентов белковых молекул, липидов, ДНК клетки.

Одним из фундаментальных механизмов поддержания гомеостаза и регулирования деятельности клеток является апоптоз, который представляет собой активную форму гибели как физиологический механизм устранения функционально неполноценных, дефектных по рецепторному представительству клеток. К ключевым механизмам реализации апоптоза относят активацию каспазного каскада ферментов [1]. Каспазы – цистеиновые протеазы, представляющие собой потенциальные мишени для атаки АФК.

Для поддержания окислительно-восстановительного равновесия клетки большое значение имеют сопряженные эффекты глутатиона и НАДФН-зависимой глутатионредуктазы, осуществляющей его восстановление [2]. Одна из важных функций глутатиона в редокс-регуляции клетки связана с образованием смешанных дисульфидов с тиоловыми группами белков, что обеспечивает защиту функциональных SH-групп белков от дальнейшего необратимого окисления [3]. Акцепторами электронов в свободно-радикальных реакциях могут являться не только сульфгидрильные группы, но и карбоксильные, амидные, заряженные аминогруппы, пептидные и дисульфидные связи, а также ароматические радикалы аминокислот [4, 5], что приводит к изменению функциональной активности регуляторных белков.

Цель исследования – установить взаимосвязь между изменением состояния системы глутатиона, уровнем карбонилирования, глутатионилирования белков и активностью каспазы-3 в лимфоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro*.

Материал и методы

В работе использовались лимфоциты, выделенные из фракции мононуклеарных лейкоцитов крови здоровых доноров (15 мужчин и 13 женщин в возрасте от 20 до 45 лет).

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из венозной крови проводили методом градиентного центрифугирования с помощью Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich, США) ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) [6], а затем лимфоцитов – на градиенте Перколла (Sigma-Aldrich, США) ($\rho = 1,130 \text{ г/см}^3$) [7]. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью трипанового синего (Serva, США). Для постановки эксперимента использовались культуры клеток, содержащие не более 5% погибших клеток.

Для моделирования экспериментального окислительного стресса выделенные лимфоциты крови куль-

тивировали в стерильных условиях в полной питательной среде (90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), инактивированной в течение 30 мин при температуре +56 °С, Нерес в концентрации 2 ммоль (Flow, Великобритания), гентамицин (100 мкг/мл) (KRKA, Словения) и L-глутамин (0,3 мг/мл) («Вектор-Бест», Россия)) в течение 18 ч в полуоткрытой системе при температуре +37 °С в атмосфере 5% CO₂ в присутствии пероксида водорода в конечной концентрации 0,5 ммоль [8]. Для установления роли окислительной модификации белков в регуляции функциональной активности каспазы-3 при экспериментальном окислительном стрессе изменяли редокс-статус изучаемых клеток с помощью блокатора SH-групп – N-этилмалеимид (NEM) (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 5 ммоль [9] и протектора SH-групп протеинов – 1,4-дифенилэритритол (DTE) (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 5 ммоль [10].

После инкубации лимфоциты крови трижды отмывали 0,01 моль натрий-фосфатным буфером (pH = 7,4) (Amresco, США), центрифугировали, ресуспендировали в буфере с добавлением 1%-го тритона X-100, выдерживали на льду и готовили лизат с сохранением стандартной концентрации клеток для определения уровня карбонильных производных белков и активности каспазы-3. Для определения содержания восстановленного, окисленного и белково-связанного глутатиона лизат лимфоцитов крови депротеинировали с 5%-м раствором сульфосалициловой кислоты.

Далее спектрофотометрически оценивали содержание восстановленного (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) методом ферментативной рециркуляции и блокирования SH-групп GSH винилпиридином (Wako, Япония). Для расчета концентрации глутатиона строили калибровочный график, используя раствор GSH и GSSG (Sigma-Aldrich, США) с концентрациями от 3 до 100 мкмоль [11]. Результаты представляли в нмоль/мг белка. Дополнительно рассчитывали величину соотношения GSH/GSSG как показатель редокс-статуса клетки.

Уровень белково-связанного глутатиона определяли спектрофотометрическим методом после предварительного его высвобождения 1%-м боргидратом натрия (Sigma-Aldrich, США) из связи с белками [12]. Результаты представляли в нмоль/мг белка.

Оценку содержания карбонильных производных белков проводили методом иммуно-ферментного анализа с использованием набора Carbonyl Proteine ELISA Kit (Immundiagnostik AG, Германия) согласно инструкции фирмы-производителя. Метод основан на реакции карбонильных производных белков с 2,4-ди-

нитрофенилгидразином. Результаты представляли в нмоль/мг белка.

Активность каспазы-3 определяли спектрофлуориметрическим методом по способности избирательного гидролиза синтетического тетрапептидного флюоригенного субстрата N-acetyl-(Asp-Glu-Val-Asp)-7-amino-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) (Sigma-Aldrich, США) с образованием amino-4-methylcoumarin (AMC), который флюоресцировал в диапазоне длин волн 430–460 нм (максимум возбуждения флюоресценции при длине волны 380 нм). Результаты представляли в пмоль освобожденного AMC/мин на 1 мг белка в пробе [13, 14].

Содержание белка в клетках определяли по взаимодействию красителя Кумасси голубого G-250 с остатками аминокислот лизина и аргинина белковых молекул [15], используя калибровочный график, построенный на основе стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина с концентрациями от 1 до 10 мкг/100 мл.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы Statistica 6,0 for Windows. Проверку нормальности распределения количественных показателей выполняли с использованием критерия Шапиро–Уилки. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы Me , верхнего и нижнего квартилей Q_1 – Q_3 . Наличие связи между показателями определяли с использованием корреляционного анализа по методу Спирмена. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ [16].

Результаты и обсуждение

Повышение внутриклеточной генерации АФК в лимфоцитах крови приводит к нарушению баланса между про- и антиоксидантами. Активные формы кислорода, такие как супероксидный анион-радикал, перекись водорода, гидроксильный и пероксидный радикалы, синглетный кислород, гипохлорит, пероксинитрит могут выступать в качестве вторичных мессенджеров, принимающих сигнал от внешнего воздействия на клетку [17]. АФК также способны индуцировать окислительные повреждения основных макромолекул клетки, в первую очередь белков. Белки, подвергшиеся окислительной деструкции, изменяют свою функциональную активность и имеют более длительный период распада, по сравнению с продуктами липидной модификации, что делает эти протеины перспективным маркером интенсивности свободно-радикального окисления [18]. Важную роль в антиоксидантной защите и поддержании редокс-баланса клетки играют легко окисляемые

пептиды, в состав которых входят SH-группы цистеина. Среди таких соединений первое место занимает трипептид глутатион [3].

При моделировании окислительного стресса *in vitro* в лимфоцитах крови было установлено статистически значимое увеличение содержания GSH (в 2,77 раза, $p < 0,05$), GSSG (в 1,54 раза, $p < 0,05$), белково-связанного глутатиона (в 2,80 раза, $p < 0,05$), нерепарируемых карбонильных производных белков (в 2,40 раза, $p < 0,05$), которое сопровождалось повышением активности каспазы-3 в 2,07 раза ($p < 0,05$) по сравнению с интактными клетками (таблица).

При оценке клеточного ответа на дополнительное внесение NEM и пероксида водорода в среду инкубации лимфоцитов крови было установлено статистически значимое снижение концентрации белково-связанного глутатиона (в 7,00 раза, $p < 0,05$) и величины соотношения GSH/GSSG (в 8,41 раза, $p < 0,05$) за счет резкого снижения концентрации GSH (в 41,60 раза, $p < 0,05$) и GSSG (в 5,66 раза, $p < 0,05$) на фоне увеличения концентрации карбонильных производных белков в 1,59 раза ($p < 0,05$) и активности каспазы-3 в 1,49 раза ($p < 0,05$) по сравнению с клетками в условиях окислительного стресса *in vitro*, а также статистически значимое снижение концентрации белково-связанного глутатиона в 9,50 раза ($p < 0,05$) на фоне увеличения концентрации карбонильных производных белков в 1,30 раза ($p < 0,05$) и активности каспазы-3 в 2,45 раза ($p < 0,05$) по сравнению с клетками в условиях блокирования SH-групп протеинов лимфоцитов крови (таблица). Полученные результаты указывают на активацию ферментативной активности эффекторной каспазы-3 в случае дополнительного внесения NEM в среду инкубации лимфоцитов крови в условиях окислительного стресса из-за накопления нерепарируемых карбонильных производных белков.

Дополнительное внесение DTE и пероксида водорода в среду инкубации лимфоцитов крови сопровождалось статистически значимым увеличением соотношения GSH/GSSG в 2,71 раза ($p < 0,05$) за счет снижения концентрации GSH в 1,61 раза ($p < 0,05$) и GSSG в 3,40 раза ($p < 0,05$) на фоне сопоставимых значений концентрации белково-связанного глутатиона, карбонильных производных белков и активности каспазы-3 по сравнению с клетками в условиях окислительного стресса *in vitro*, а также статистически значимым увеличением содержания как белково-связанного глутатиона в 1,57 раза ($p < 0,05$) за счет резкого снижения GSSG в 2,80 раза ($p < 0,05$), так и нерепарируемых карбонильных производных белков в 2,24 раза ($p < 0,05$) на фоне менее значительной активации каспазы-3 в 1,84 раза ($p < 0,05$) по сравнению

Содержание фракций глутатиона, окислительно-модифицированных производных белков и активность каспазы-3 в лимфоцитах крови и (или) в условиях окислительного стресса *in vitro*, при действии блокатора (N-этилмалеимид), протектора (1,4-дитиоэритритол) SH-групп протеинов ($Me(Q_1-Q_3)$)

Группа	Показатель					
	Восстановленный глутатион (GSH), нмоль/мг белка	Окисленный глутатион (GSSG), нмоль/мг белка	GSH/GSSG	Каспаза-3, пмоль/(мин · мг белка)	Белково-связанный глутатион, нмоль/мг белка	Карбонильные производные белков, нмоль/мг белка
Лимфоциты	0,75 (0,74–0,88)	0,11 (0,10–0,12)	7,17 (6,52–8,00)	108,44 (103,48–112,66)	0,05 (0,04–0,06)	0,149 (0,142–0,151)
Лимфоциты + N-этилмалеимид	0,25 (0,20–0,28)*	0,08 (0,05–0,10)	3,20 (2,60–3,79)*	136,46 (135,41–137,33)*	0,19 (0,12–0,29)*	0,437 (0,429–0,441)*
Лимфоциты + 1,4-дитиоэритритол	1,04 (0,51–1,15)	0,14 (0,12–0,17)	6,90 (4,77–7,33)	121,22 (120,90–122,73)*	0,07 (0,06–0,07)	0,164 (0,161–0,179)
Лимфоциты + H ₂ O ₂	2,08 (1,52–2,16)*	0,17 (0,15–0,17)*	12,46 (10,71–12,78)*	224,16 (220,34–227,18)*	0,14 (0,13–0,15)*	0,359 (0,354–0,362)*
Лимфоциты + H ₂ O ₂ + N-этилмалеимид	0,05 (0,04–0,06)▼·°	0,03 (0,03–0,04)▼·°	1,48 (1,22–1,99)▼·°	334,67 (331,25–337,56)▼·°	0,02 (0,017–0,023)▼·°	0,572 (0,562–0,577)▼·°
Лимфоциты + H ₂ O ₂ + 1,4-дитиоэритритол	1,29 (1,25–1,33)▼·*	0,05 (0,04–0,07)▼·*	27,07 (19,68–32,02)▼·*	223,87 (221,56–226,09)*	0,11 (0,10–0,12)*	0,368 (0,362–0,374)*

Примечание. * – $p < 0,05$ уровень статистической значимости различий по сравнению с лимфоцитами крови; ▼ – $p < 0,05$ уровень значимости различий по сравнению с группой лимфоциты + H₂O₂; ° – $p < 0,05$ уровень значимости различий по сравнению с группой лимфоциты + N-этилмалеимид; * – $p < 0,05$ уровень значимости различий по сравнению с группой лимфоциты + 1,4-дитиоэритритол.

с клетками в условиях протекции SH-групп протеинов лимфоцитов крови (таблица). Участие глутатиона в активации каспазы-3 подтверждается наличием отрицательной корреляционной связи между белково-связанным глутатионом и активностью фермента ($r = -0,89$, $p < 0,05$) при добавлении протектора SH-групп в среду инкубации лимфоцитов крови.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что компоненты системы глутатиона и окислительная модификация белков влияют на активацию эффекторной каспазы-3 в условиях изменения редокс-статуса лимфоцитов крови.

Заключение

Наличие цистеиновых остатков в строении каспазы-3 позволяет отнести ее к потенциальным молекулярным эффекторам, выступающим в качестве сенсоров АФК при изменении редокс-статуса лимфоцитов крови. Окисленная форма глутатиона, являясь высоко-реакционной молекулой, способна взаимодействовать с SH-группами белков, в том числе с каспазой-3, приводя к изменению функциональной активности.

Поиск подходов редокс-регуляции апоптоза, индуцированного окислительным стрессом, позволит повысить эффективность существующих методов патогенетической терапии большого числа социально-значимых заболеваний с вовлечением в процесс лимфоцитов крови и откроет широкие перспективы для

молекулярных технологий селективного управления программированной клеточной гибелью.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского гуманитарного научного фонда в рамках научного проекта № 15-36-01289.

Литература

- Häcker H.G., Sisay M.T., Gütschow M. Allosteric modulation of caspases // *Pharmacology & therapeutics*. 2011. 132 (2). P. 180–195.
- Кулинский В.И., Колесниченко А.С. Глутатион ядра клетки и его функции // *Биомед. химия*. 2010. Т. 56, № 6. С. 657–662.
- Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Ткачев В.О. Некоторые принципы и механизмы редокс-регуляции // *Кислород и антиоксиданты*. 2009. № 1. С. 3–64.
- Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб.: Мед. пресса, 2006. 400 с.
- Иванов А.С. Основные принципы конформационного разнообразия белков для медико-биологов // *Биомед. химия*. 2011, Т. 57, № 1. С. 31–60.
- Bignold L.P., Ferrante A. Mechanism of separation of polymorphonuclear leukocytes from whole blood by the one-step Hypaque-Ficoll method // *Journal of Immunological Methods*. 1987. V. 96, № 1. P. 29–33.
- Ulmer A.J., Flad H.D. Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leukocytes using Percoll as gradient medium // *Journal of Immunological Methods*. 1979. V. 30, № 1. P. 1–10.
- Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Коновалова Е.В., Носарева О.Л., Наумова А.И., Орлов Д.С., Веснина О.Н.,

- Новицкий В.В. Моделирование окислительного стресса в лимфоцитах крови *in vitro* для изучения апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat // Казанский мед. журн. 2013. Т. XCIV, № 5. С. 736–740.
9. Brunelli L., Crow J.P., Beckman J.S. The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli* // Archives of biochemistry and biophysics. 1995. V. 316. P. 327–333.
 10. Sabaf B., Heydari K., Herzenberg L.A. Lymphocyte surface thiol levels // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003. V. 100, № 7. P. 4001–4005.
 11. Kojima S., Nakayama K., Ishida H. Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth // Journal of radiation research. 2004. V. 45, № 1. P. 33–39.
 12. Burchill B.R., Oliver J.M., Pearson C.B., Leinbach E.D., Berlin R.D. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes // Journal of Cell Biology. 1978. V. 76, № 2. P. 439–447.
 13. Coben G.M. Caspases: the executioners of apoptosis // The Biochemical Journal. 1997. V. 326. P. 1–16.
 14. Nicholson D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death // Cell Death and Differentiation. 1999. № 6. P. 1028–1042.
 15. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. V. 7, № 1. P. 248–254.
 16. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
 17. Wang J.Y., Lee C.T., Wang J.Y. Nitric oxide plays a dual role in the oxidative injury of cultured rat microglia but not astroglia // Neuroscience. 2014. V. 281. P. 164–177.
 18. Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях // Украинский биохим. журн. 2008. Т. 80, № 6. С. 5–18.

Поступила в редакцию 09.09.2015 г.

Утверждена к печати 13.11.2015 г.

Носарева Ольга Леонидовна (✉) — канд. мед. наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Степовая Елена Алексеевна — д-р мед. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Рязанцева Наталья Владимировна — д-р мед. наук, профессор кафедры биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирский федеральный университет (г. Красноярск); д-р мед. наук, профессор кафедры биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск).

Шахристов Евгений Викторович — канд. мед. наук, руководитель научно-образовательного центра молекулярной медицины СибГМУ (г. Томск).

Веснина Оксана Николаевна — соискатель ученой степени кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Новицкий Вячеслав Викторович — академик РАН, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

✉ Носарева Ольга Леонидовна, тел. 8-923-411-19-51; e-mail: olnosareva@yandex.ru

THE ROLE OF PROTEIN OXIDATIVE MODIFICATION IN REDOX-REGULATION OF CASPASE-3 ACTIVITY IN BLOOD LYMPHOCYTES DURING OXIDATIVE STRESS *IN VITRO*

Nosareva O.L.¹, Stepovaya Ye.A.¹, Ryazantseva N.V.^{2,3}, Shakhristova Ye.V.¹, Vesnina O.N.¹, Novitsky V.V.¹

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

² Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

³ Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation

ABSTRACT

The formation of oxidative stress lies at the heart of many frequent and socially-important diseases. Blood lymphocytes are the cells which provide immunological control of our organism. As a result of their function implementation blood lymphocytes contact with different endogenic and exogenic factors, which can lead to active oxygen species production activation, macromolecules oxidative modification and to cell survival alteration. At the present time it is essential to expand and deepen the fundamental knowledge of blood lymphocytes apoptosis regulation peculiarities.

The research objective was to establish the interaction among alterations of glutathione system condition, carbonylation level, protein glutathionylation and caspase-3 activity in blood lymphocytes during oxidative stress *in vitro*.

Material and Methods. The material for research was blood lymphocytes cultivated with addition of hydrogen peroxide in final concentration of 0,5 mmol and/or protein SH-group inhibitor N-ethylmaleimide – 5 mmol, protector – 5 mmol – 1,4-dithioerythritol.

Reduced, oxidized and protein-bound glutathione concentration was measured by method of spectrophotometry, additionally, the ratio size of reduced to oxidized thiol fraction was estimated. With help of enzyme immunoassay the level of protein carbonyl derivatives was evaluated; caspase-3 activity was registered by spectrofluorometric method.

Results. Protein SH-group blocking in blood lymphocytes during oxidative stress *in vitro* was accompanied by protein-bound glutathione concentration rapid decrease in connection with increase of protein carbonyl derivatives content and caspase-3 activity. Protein SH-group protection in blood lymphocytes during oxidative stress *in vitro* was accompanied by concentration increase of protein-bound glutathione and protein carbonyl derivatives under comparable values of enzyme activity under study.

Conclusion. The carried out research shows that caspase-3 and protein-bound glutathione are the molecular targets of selective control over programmed cell death.

The received indices of caspase-3 activity change and protein-bound glutathione concentration alteration in blood lymphocytes during oxidative stress *in vitro* can be used when elaborating target therapy approaches to diseases accompanied by apoptosis disregulation.

KEY WORDS: blood lymphocytes, oxidative stress, glutathione system, cell redox-status, oxidative protein modification, caspase-3.

Bulletin of Siberian Medicine, 2015, vol. 14, no. 6, pp. 61–67

References

1. Häcker H.G., Sisay M.T., Gütschow M. Allosteric modulation of caspases. *Pharmacology & therapeutics*, 2011, 132 (2), pp. 180–195.
2. Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S. Glutathion yadra kletki i ego funktsii [Nuclear glutathione and its functions]. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 2010, vol. 56, no. 6, pp. 657–662. (in Russian).
3. Zenkov N.K., Men'shchikova Ye.B., Tkachev V.O. Nekotorye printsipy i mekhanizmy redoks-regulyatsii [Some of the principles and mechanisms of redox regulation]. *Kislород i antioksidanty – Oxygen and Antioxidants*, 2009, no. 1, pp. 3–64 (in Russian).
4. Dubinina Ye.Ye. *Produkty metabolizma kisloroda v funktsional'noi aktivnosti kletok (zbizn' i smert', sozidanie i razrushenie). Fiziologicheskie i kliniko-biokhimicheskie aspekty* [Products of oxygen metabolism in the functional

- activity of cells (life and death, creation and destruction). Physiological and clinical and biochemical aspects]. St. Petersburg, Meditsinskaya pressa Publ., 2006. 400 p. (in Russian).
5. Ivanov A.S. Osnovnye printsipy konformatsionnogo raznoobraziya belkov dlya mediko-biologov [Basic principles of protein conformational diversity for medical biologists]. *Biomeditsinskaya khimiya – Biochemistry*, 2011, vol. 57, no. 1, pp. 31–60 (in Russian).
 6. Bignold L.P., Ferrante A. Mechanism of separation of polymorphonuclear leukocytes from whole blood by the one-step Hypaque-Ficoll method. *Journal of Immunological Methods*, 1987, vol. 96, no. 1, pp. 29–33.
 7. Ulmer A.J., Flad H.D. Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leukocytes using Percoll as gradient medium. *Journal of Immunological Methods*, 1979, vol. 30, no. 1, pp. 1–10.
 8. Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Konovalova E.V., Nosareva O.L., Naumova A.I., Orlov D.S., Vesnina O.N., Novitskii V.V. Modelirovanie oksidativnogo stressa v limfotsitakh krovi *in vitro* dlya izucheniya apoptoza opukholevykh kletok linii Jurkat [Modeling oxidative stress in the blood lymphocytes *in vitro* to study the apoptosis of tumor cell line Jurkat]. *Kazan Medical Journal – Kazan Medical Journal*, 2013, vol. XCIV, no. 5, pp. 736–740 (in Russian).
 9. Brunelli L., Crow J.P., Beckman J.S. The comparative toxicity of nitric oxide and peroxyxynitrite to *Escherichia coli*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1995, vol. 316, pp. 327–333.
 10. Sahaf B., Heydari K., Herzenberg L.A. Lymphocyte surface thiol levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, vol. 100, no. 7, pp. 4001–4005.
 11. Kojima S., Nakayama K., Ishida H. Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth. *Journal of radiation research*, 2004, vol. 45, no. 1, pp. 33–39.
 12. Burchill B.R., Oliver J.M., Pearson C.B., Leinbach E.D., Berlin R.D. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Cell Biology*, 1978, vol. 76, no. 2, pp. 439–447.
 13. Cohen G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal*, 1997, vol. 326, pp. 1–16.
 14. Nicholson D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, 1999, no. 6, pp. 1028–1042.
 15. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 7, no. 1, pp. 248–254.
 16. Glanc S. *Mediko-biologicheskaja statistika* [Medico-biological statistics]. Moscow, Practice Publ., 1999. 459 p. (in Russian).
 17. Wang J.Y., Lee C.T., Wang J.Y. Nitric oxide plays a dual role in the oxidative injury of cultured rat microglia but not astroglia. *Neuroscience*, 2014, vol. 281, pp. 164–177.
 18. Dubinina Ye.Ye., Pustygina A.V. Okislitel'naya modifikatsiya proteinov, ee rol' pri patologicheskikh sostojaniyah [Oxidizing modification of proteins, its role at pathological states]. *Ukrainskiy biokhimicheskiy zhurnal – The Ukrainian Biochemical Journal*, 2008, vol. 80, no. 6, pp. 5–18 (in Russian).

Nosareva Olga L. (✉), Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Stepovaya Yelena A., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Ryazantseva Natalia V., Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation; Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Shakhristova Yevgenia V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Vesnina Oksana N., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Novitsky Vyacheslav V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

✉ Nosareva Olga L., Ph. +7-923-411-19-51; e-mail: olnosareva@yandex.ru