

На правах рукописи

КЛИМОВА
Марина Викторовна

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ БЕЛКОВ
ТЕПЛОВОГО ШОКА Hsp27 И Hsp90 НА РЕЦЕПТОРНЫЙ
ПУТЬ АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

14.03.03 – патологическая физиология
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2012

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Рязанцева Наталья Владимировна

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ Новицкий Вячеслав Викторович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России Степовая Елена Алексеевна

кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения патологической анатомии и цитологии ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН Васильев Николай Вольтович

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (г. Красноярск).

Защита состоится «__» _____ 2012 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России

Автореферат разослан «__» _____ 2012г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



И.В. Петрова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности в мире, занимая второе место после сердечно-сосудистых заболеваний. Так, по данным Международного агентства по изучению рака (МАИР, International Agency for Research on Cancer (IARC)), в 2008 году было зарегистрировано 12,7 млн. новых случаев заболевания раком по всему миру, общая смертность от онкологических заболеваний составила 7,6 млн. человек в год (American Cancer Society, 2011). Для России проблема онкологических заболеваний также является актуальной: только в 2009 г. было выявлено 505 тыс. новых случаев злокачественных новообразований, что на 14,4% больше, чем в 1999 г. (441 тыс.). В 2009 г. на учете в территориальных специализированных онкологических учреждениях состояли 2,7 млн. больных, а совокупный показатель распространенности злокачественных новообразований в России составил 1897 человек на 100 000 населения [Чиссова В.И. и соавт., 2011].

В настоящее время ведется активный поиск молекулярных мишеней для таргетной терапии злокачественных новообразований. В основе молекулярных механизмов, отличающих нормальные клетки от клеток злокачественных опухолей, лежат изменения на уровне клеточных белков. В опухолевых клетках обнаружено большое количество белков, в том числе и мутантных, которые вовлечены в дисрегуляцию апоптоза. Воздействие на такие белковые молекулы может лежать в основе противоопухолевой терапии [Жданов Д.Д., Коваленко Н.А., 2010; Wu Y., Zhou B.P., 2010].

В качестве потенциальной мишени для таргетной терапии рассматриваются белки теплового шока (Hsp), поскольку быстрая пролиферация опухолевых клеток сопровождается повышенной потребностью в молекулярных шаперонах по сравнению с нормальными клетками [Андрианов А.Н., Марченко И.А., 2007; Amolins M.W., Blagg B.S.J., 2009; Trepel J. et al., 2010].

Белки теплового шока способны модулировать процесс программированной гибели клетки на различных этапах. Регулирование апоптоза с помощью белков теплового шока является защитным механизмом, который уменьшает клеточную чувствительность к неблагоприятным факторам и позволяет опухолевым клеткам выжить. Так, белки теплового шока могут принимать участие в регуляции рецепторного пути апоптоза, запуск которого происходит при связывании специфических лигандов с рецепторами семейства фактора некроза опухоли (TNF), расположенными на плазматической мембране. Наиболее изученными рецепторами данного семейства являются FasR (CD95/Apo1) и TNF-R1 (p60/p55) [Zhang G., 2004; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008].

В настоящее время выделяют несколько классов Hsps, различающихся по молекулярному весу: малые Hsp (от 8 до 28 кДа), Hsp 40, Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90, Hsp100, Hsp110 [Powers M.V., Workman P., 2007; Saibil H.R., 2008].

Наиболее значимы в регуляции апоптоза белки теплового шока Hsp 27 и Hsp90. С одной стороны, белки теплового шока участвуют в подавлении апоптоза. Например, Hsp27, соединяясь с белком Daxx, а Hsp70 и Hsp90 – с Ask-1, подавляют Fas-опосредованный апоптоз [Beere H.M., 2004]. С другой стороны, известна и проапоптотическая роль белков теплового шока. Так, Hsp27 может участвовать в индукции TNF-зависимого апоптоза, ингибируя I κ B деградацию [Richa A. et al., 2007]. Однако, по данным других авторов [Parcellier et al., 2003], Hsp27 вызывает активацию NF- κ B, оказывая тем самым антиапоптотический эффект.

Повышение синтеза белков теплового шока имеет место в клетках многих видов опухолей, например, уровень Hsp90 возрастает при острых лейкомиях, немелкоклеточной карциноме лёгкого, раке пищевода, саркоме поджелудочной железы, меланоме, а высокая экспрессия Hsp27 отмечается при раке яичников, желудка, печени и простаты, аденокарциноме эндометрия, раке пищевода и злокачественной фиброзной гистиоцитоме [Ogata M. et al., 2000; Becker V. et al., 2004; Ciocca D.R., Calderwood S.K., 2005; Gallegos Ruiz M.I. et al., 2008]. В качестве экспериментальной модели, позволяющей лучше понять механизмы влияния белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 на реализацию рецепторного пути апоптоза в опухолевых клетках, могут быть использованы культуры опухолевых клеток, например, линий Jurkat (Т-лимфобластного лейкоза человека) и ТНР-1 (промоноцитарной лейкемии человека).

Таким образом, представленные в литературе данные о влиянии белков теплового шока на регуляцию рецепторного пути апоптоза носят весьма неоднозначный характер. В связи с этим научный интерес представляет, на наш взгляд, идентификация роли белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в молекулярных механизмах регуляции рецепторного пути апоптоза опухолевых клеток. Знание этих механизмов открывает перспективы для идентификации молекулярных фармакологических мишеней для таргетной терапии злокачественных новообразований посредством использования селективных ингибиторов белков теплового шока.

Цель исследования: установить молекулярные механизмы регуляторного влияния белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 на реализацию рецепторного пути апоптоза опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1.

Задачи исследования:

1. Оценить состояние системы рецепторов Fas, TNF (TNF-R1 и sTNF-R1) и их лигандов (FasL, TNF- α) в опухолевых клетках линий Jurkat, ТНР-1 и мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, в условиях действия селективных ингибиторов белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 (5-(5-Ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)isoxazole (KRIBB3) и 17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), соответственно).

2. Установить характер влияния белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 на инициаторную каспазу-8 рецепторопосредованного пути реализации апоптоза в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1.

3. Выявить изменения содержания фактора транскрипции NF- κ B в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 при действии селективных ингибиторов 17-ААG и KRIBB3 *in vitro*.

4. Идентифицировать общие закономерности и особенности влияния белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 и их фосфорилированных форм на рецепторный путь регуляции апоптоза опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1.

Научная новизна. Впервые идентифицирована роль белков теплового шока Hsp27, Hsp90 и их фосфорилированных форм в регуляции рецепторного пути апоптоза опухолевых клеток (линии ТНР-1 и Jurkat). Установлено, что в опухолевых клетках линии ТНР-1 шаперон Hsp27 принимает участие в увеличении образования растворимых форм цитокина TNF- α и презентации FasL, а также снижении количества TNF-R1⁺, FasR⁺-клеток; белок Hsp90 влияет только на увеличение продукции TNF- α и угнетение презентации TNF-R1 на поверхности клеточной мембраны. Показано, что в опухолевой линии Jurkat белки теплового шока Hsp27 и Hsp90 вовлечены в увеличение презентации FasR, FasL и повышение продукции TNF- α ; действие Hsp90 сопряжено с увеличением количества клеток, несущих TNF-R1. Выявлено, что белки теплового шока Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках линий ТНР-1 и Jurkat участвуют в снижении содержания инициаторной каспазы-8 и транскрипционного фактора NF- κ B. Впервые показана возможность использования селективного ингибитора белка теплового шока Hsp27 (KRIBB3) для индукции апоптоза в опухолевых клетках. Продемонстрировано отсутствие проапоптотического влияния селективных ингибиторов белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в отношении мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у здоровых доноров.

Теоретическая и практическая значимость. Получены новые знания фундаментального характера о механизмах дисрегуляции рецепторного пути апоптоза белками теплового шока Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках линий ТНР-1 и Jurkat. Результаты проведенного исследования раскрывают роль белков теплового шока в модуляции системы рецепторов Fas, TNF (TNF-R1 и sTNF-R1) и их лигандов (FasL, TNF- α), а также характер влияния данных белков на основные компоненты рецептор–опосредованного пути реализации апоптоза (каспаза-8, NF- κ B) в опухолевых клетках. Результаты настоящего исследования могут быть положены в основу разработки технологических основ таргетной терапии при злокачественных новообразованиях на основе ингибиторов белков теплового шока Hsp27 и Hsp90.

Положения, выносимые на защиту:

1. Механизмы ингибирования апоптоза в опухолевых клетках Jurkat и ТНР-1 с участием белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 опосредованы снижением содержания инициаторной каспазы-8 и транскрипционного фактора NF- κ B, а также модификацией Fas- и TNF-систем регуляции апоптоза.

2. Модулирующее влияние белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 на Fas-систему зависит от типа клеток: в клеточной линии Jurkat регулирующее

действие данных белков сопряжено с увеличением количества клеток, презентующих на своей поверхности FasR и FasL, для опухолевой культуры ТНР-1 значение имеет только Hsp27, который обеспечивает снижение числа клеток, несущих FasR и повышение количества FasL-позитивных клеток.

3. Белки теплового шока Hsp27 и Hsp90 действуют на TNF-систему в опухолевых клетках разнонаправленно: снижают количество TNF-R1-позитивных клеток и увеличивают продукцию TNF- α опухолевой культурой ТНР-1; в опухолевой клеточной линии Jurkat рост продукции провоспалительного цитокина TNF- α обеспечивается Hsp27 и Hsp90, а уменьшение количества клеток, презентующих TNF-R1, сопряжено только с шапероном Hsp90.

Апробация и реализация работы. Результаты проведенных исследований докладывались на XII межрегиональной научно-практической конференции (г. Абакан, 2009), XVI межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 2010), Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (г. Санкт-Петербург, 2010), III общероссийской научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине» (г. Сочи, 2010), IV международной научной конференции молодых ученых-медиков (г. Курск, 2010), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки» (г. Ярославль, 2010), V международной (XIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (г. Москва, 2010), 13-ой межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы медицины» (г. Абакан, 2010), 6-ом международном конгрессе по патфизиологии «Gene-environment interaction in health and disease» (Montreal, Canada, 2010), VI региональной конференции молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (г. Томск, 2011), Первой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (г. Санкт-Петербург, 2010), 4-ой международной телеконференции «Фундаментальные науки и практика» (г. Томск, 2011), 14-ой межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы медицины» (г. Абакан, 2011), VI международной научной Пироговской медицинской конференции студентов и молодых ученых (г. Москва, 2011), международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Пущино, 2011), межрегиональной конференции с международным участием «Науки о человеке» (г. Томск, 2011).

Работа выполнена в рамках проектов ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» – «Идентификация молекулярных мишеней коррекций нарушений регуляции апоптоза опухолевых клеток» (ГК № П1203 от 27.08.09) и «Разработка

технологической платформы молекулярной диагностики и лечения социально-значимых заболеваний и подготовка на ее основе научно-исследовательских кадров для молекулярной медицины» (ГК № 02.740.11.0311), проектов, поддержанных Советом по грантам при Президенте РФ для поддержки молодых кандидатов наук по проблеме «Исследование молекулярных механизмов регуляторного влияния белков теплового шока на апоптоз опухолевых клеток» (ГК №16.120.11.480 – МК), а также грантами Carl Zeiss по программе поддержки научно-исследовательской работы молодых ученых: «Роль белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat» (от 23.12.2009 г. № СибГМУ 1/11 КЦ) и «Модуляция апоптоза опухолевых и нормальных лимфоцитов ингибиторами белков теплового шока» (№ СибГМУ 1/11 КУ).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 22 работы, из которых 3 – в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 14 рисунками и 8 таблицами. Библиографический указатель включает 292 источника (46-отечественных и 246 - иностранных).

ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу работы положены результаты исследования влияния белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 на рецепторопосредованный апоптоз опухолевых клеток линий Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз человека) и ТНР-1 (острая моноцитарная лейкемия человека), а также мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных при обследовании 40 относительно здоровых доноров (17 мужчин, 23 женщины в возрасте от 18 до 35, средний возраст – $23,7 \pm 3,5$ лет). Критерием включения доноров в программу исследования служило отсутствие у них онкологических, наследственных, психических заболеваний в анамнезе, наркотической и алкогольной зависимости, а также острых инфекционных, хронических воспалительных процессов в стадии обострения на момент взятия крови. Материалом исследования явились клетки опухолевой линии Jurkat и ТНР-1, полученные из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург), и венозная кровь, полученная у здоровых доноров утром натощак (кровь стабилизировали гепарином – 25 Ед/мл или ЭДТА – 1,8 мг/мл) с соблюдением процедуры информированного согласия.

Исследование проводилось на базе Научно-образовательного центра молекулярной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (руководитель – канд. мед. наук О.Е. Савельева).

Для изучения механизмов молекулярного влияния белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 на рецепторный путь запуска апоптоза в опухолевых клетках были использованы селективные ингибиторы этих белков и индукция апоптоза в условиях *in vitro*. Данное исследование было разделено на несколько этапов.

На первом этапе осуществляли подбор апоптотических доз селективных ингибиторов белков теплового шока Hsp27, Hsp90 и индуктора программированной гибели клеток. Затем оценивали закономерности реализации апоптоза и внутриклеточное содержание белков теплового шока Hsp27, Hsp90 и их фосфорилированных форм. На следующем этапе проводили оценку апоптотической реакции клеток при ингибировании белков теплового шока и в условиях действия индуктора программированной гибели клеток. Далее были выяснены особенности реализации рецепторного пути запуска апоптоза в условиях ингибирования белков теплового шока Hsp27, Hsp90 и индукции апоптоза (определена презентация FasR, FasL и TNF-R1 на поверхности клеток и концентрация растворимых форм sTNF-R1 и TNF- α , оценено внутриклеточное содержание каспазы-8 и транскрипционного фактора NF- κ B).

Распределение клеток опухолевых линий Jurkat, ТНР-1 и мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у здоровых доноров, в соответствии с использованными методами исследования представлено в таблице 1.

Для выяснения роли белка теплового шока Hsp27 в регуляции рецепторного пути апоптоза использовали KRIBB3 (5-(5-Ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)isoxazole) («Sigma-Aldrich», США). Для подбора апоптотической дозы ингибитора белка теплового шока Hsp27 опухолевые клетки линии Jurkat (плотность 2×10^6 клеток/мл) культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 18 ч в присутствии KRIBB3 в различных концентрациях (0,1; 1; 5 и 10 мкМ). Для дальнейшего изучения проапоптотического действия ингибитора Hsp27 на опухолевые клетки нами была выбрана концентрация KRIBB3 0,1 мкМ.

Для ингибирования белка теплового шока Hsp90 использовали 17-AAG (17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin) («Sigma-Aldrich», США). Опухолевые клетки линии Jurkat (плотность 2×10^6 клеток/мл) культивировали с 17-AAG в дозах 0,5; 2; 5 и 20 мкМ. Для дальнейшего использования 17-AAG была выбрана концентрация 5 мкМ.

Для индукции апоптоза был использован препарат дексаметазон («KRKA», Словения). Для определения апоптотической дозы дексаметазона в опухолевых клетках линии Jurkat использовали данный препарат в следующих конечных концентрациях 0,005, 0,01, 0,1 и 1 мкМ. Далее использовали концентрацию дексаметазона 0,01 мкМ.

Мононуклеарные лейкоциты выделяли из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования у здоровых доноров [Натвиг Дж. и соавт., 1980]. В пробирки для центрифугирования в соотношении 1:2 вносили фиколл Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция), а затем наслаивали цельную венозную кровь, центрифугировали 20 мин при 1500 об/мин, после чего собирали кольцо лейкоцитов в чистые центрифужные пробирки и трижды промывали 0,9% раствором NaCl.

Таблица 1

Распределение опухолевых клеток (линии Jurkat и ТНР-1) и мононуклеарных лейкоцитов в соответствии с использованными методами исследования

Методы исследования	Условия культивирования	Экспериментальные модели		
		Мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров	Опухолевые клетки линии Jurkat	Опухолевые клетки линии ТНР-1
1	2	3	4	5
Оценка содержания белков Hsp27, Hsp90 и их фосфорилированных форм методом вестерн-блоттинга	Интактные клетки	24	24	24
Оценка реализации запрограммированной клеточной гибели в аннексиновом тесте методом флуоресцентной микроскопии	Интактные клетки	15	30	15
	Дексаметазон (10^{-5} моль/мл)	15	35	15
	17-ААG (5 мкМ)	15	35	15
	KRIBB3 (0,1 мкМ)	15	30	15
	Дексаметазон и 17-ААG	15	15	15
	Дексаметазон и KRIBB3	15	15	15
Оценка количества TNF-R1, FasR и FasL презентующих клеток методом проточной лазерной цитометрии	Интактные клетки	26	30	28
	Дексаметазон (10^{-5} моль/мл)	24	32	24
	17-ААG (5 мкМ)	26	32	28
	KRIBB3 (0,1 мкМ)	26	27	26
	Дексаметазон и 17-ААG	26	30	24
	Дексаметазон и KRIBB3	26	30	24
Определение концентрации TNF- α , sTNF-R1 в супернатантах клеточных культур методом иммуноферментного анализа	Интактные клетки	16	18	20
	Дексаметазон (10^{-5} моль/мл)	16	22	20
	17-ААG (5 мкМ)	17	22	18
	KRIBB3 (0,1 мкМ)	16	20	20
	Дексаметазон и 17-ААG	16	16	20
	Дексаметазон и KRIBB3	18	20	16

<i>Продолжение табл. 1</i>				
1	2	3	4	5
Определение содержания каспазы-8 в клеточных лизатах методом иммуноферментного анализа	Интактные клетки	8	8	8
	Дексаметазон (10^{-5} моль/мл)	8	8	8
	17-ААГ (5 мкМ)	10	10	10
	KRIBB3 (0,1 мкМ)	10	10	10
	Дексаметазон и 17-ААГ	8	8	8
	Дексаметазон и KRIBB3	8	8	8
Оценка экспрессии транскрипционного фактора NF-kB методом вестерн-блоттинга	Интактные клетки	6	6	6
	Дексаметазон (10^{-5} моль/мл)	6	6	6
	17-ААГ (5 мкМ)	6	6	6
	KRIBB3 (0,1 мкМ)	6	6	6
	Дексаметазон и 17-ААГ	6	6	6
	Дексаметазон и KRIBB3	6	6	6

Опухолевые клетки и мононуклеарные лейкоциты культивировали суспензионным способом в полной питательной среде, содержащей 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Новосибирск), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Invitrogen», США), инактивированной при 56°C в течение 30 мин, 0,3 мг/мл L-глутамин («Вектор-Бест», Новосибирск) и 100 мкг/мл гентамицина («INS», США) при 37°C и 5% CO_2 .

Оценку реализации апоптоза проводили методом флуоресцентной микроскопии с использованием FITC-меченного аннексина V и пропидия йодида («Beckman Coulter», США).

Методом иммуноферментного анализа проводили определение содержания каспазы-8 в лизатах клеток с помощью тест-систем («Bender MedSystems», Австрия), количественное определение концентрации TNF- α и sTNF-R1 в супернатантах проводили по протоколу фирм-производителей («Bender MedSystem», Австрия).

Количественную оценку TNF-R1-позитивных клеток осуществляли с помощью моноклональных антител к мембранным рецепторам к TNF- α по протоколу фирмы-производителя (Beckam Coulter, Франция) с помощью проточного цитофлуориметра FACSCanto II («Becton Dickinson», США) по каналу FL-2. Определение клеток, несущих FasR и FasL, проводили с использованием набора моноклональных антител к человеческому антигену CD95 (Fas/APO-1) и FasL («Invitrogen», США) на проточном цитофлуориметре FACSCanto II («Becton Dickinson», США) по каналам FL-1 (FasR) и FL-2 (FasL).

Для определения содержания белков теплового шока (Hsp27, Hsp90) и транскрипционного фактора (NF-kB) был использован метод вестерн-блоттинга. Образцы для анализа получали путем лизирования клеток. Белки

разделяли по молекулярной массе методом электрофореза в 5%-ном концентрирующем полиакриламидном геле (0,13М Tris-HCl, pH=6,8, 5% Bis-Acrylamide («Helikon», США)) и 10%-ном разделяющем полиакриламидном геле (375М Tris-HCl, pH=8,8, 10% Bis-Acrylamide, содержащие 0,1% додецилсульфата натрия, 0,1% PSA («Bio-Rad», США), 0,08% TEMED («Helikon», США) под действием электрического поля (10 В/см пути). Далее осуществляли перенос разделенных в геле белков на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) в буфере для переноса pH=8.3 (25М Tris, 192М глицин, 20% метанол) при силе тока 45 мА. Мембрану с перенесенными белками блокировали 1% раствором желатина, а затем инкубировали с первичными моноклональными антителами к NF-κB p65 в разведении 1:1000 («Sigma», США), Hsp27 (phospho S78) в разведении 1:2000, Hsp90 (1 мкг/мл) и поликлональными антителами к Hsp90 (phospho S226) в разведении 1:1000, Hsp27 (0,5 мкг/мл) («Abcam», Великобритания). Детекцию разделенных белков проводили путем добавления хемилюминесцентного субстрата ECL («Invitrogen», США). Вывод о содержании исследуемого белка в клетке делали по изменению отношения величины сигнала метки искомого белка к величине сигнала с фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH), используя программное обеспечение TotalLab. Результаты выражали в условных единицах.

Анализ полученных данных осуществляли с помощью методов статистического анализа. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро-Вилка. Для каждого анализируемого показателя вычисляли среднее (M) и стандартное отклонение (σ) (для выборок, распределённых по нормальному закону) и медиану (Me) и квартили (Q₁-Q₃) (для выборок, не подчиняющихся нормальному закону). Анализ данных, подчиняющихся нормальному закону распределения, проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа, для выборок, не имеющих нормального закона распределения, применяли непараметрический критерий Крускала-Уолиса (попарный анализ проводили с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [Гланц С., 1999].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время ведется активное изучение механизмов, позволяющих опухолевым клеткам ингибировать апоптоз. Известно, что опухолевые клетки часто становятся невосприимчивыми к воздействию внешних сигналов, которые реализуют свое действие через специализированные клеточные рецепторы, такие как TNF-R1 и FasR [Новиков В.В. и соавт., 2007]. Опухолевые клетки выработали ряд механизмов, препятствующих реализации рецепторного пути апоптоза: они способны продуцировать большое количество лигандов и презентировать небольшое количество рецепторов FasR, TNF-R1 и TRAIL-

R1/R2 на своей поверхности, «слушивать» экстрацеллюлярную часть рецепторов и синтезировать неполноценные рецепторы смерти, которые лишены либо имеют неполноценные домены смерти. Для опухолевых клеток характерна также сниженная активность прокаспазы-8 и повышенный уровень ее ингибитора – белка FLIP и др. [Ройт А. и соавт., 2000; Cichorek M., 2008]. Еще одним механизмом, способствующим выживанию опухолевых клеток, является увеличенный синтез ряда белков, например белков теплового шока, которые могут воздействовать на основные сигнальные компоненты клеточного цикла и препятствовать реализации апоптоза, в том числе и рецепторного его пути [Kim H.J. et al., 2007].

Учитывая эти факты, на первом этапе настоящего исследования была проведена оценка особенностей реализации апоптоза и внутриклеточного содержания белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в мононуклеарных лейкоцитах и клетках опухолевых линий Jurkat и ТНР-1. При анализе процентного содержания клеток, вступивших в апоптоз, нами было установлено, что в опухолевых клеточных культурах Jurkat и ТНР-1 количество их было достоверно сниженным, по сравнению с культурой мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров ($p < 0,05$; рис. 3, 4).

Белки теплового шока могут негативно воздействовать на составляющие как внешнего, так и внутреннего путей апоптоза [Lanneau D. et al., 2008]. Поэтому мы провели оценку содержания белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках и мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров (рис. 1, 2).

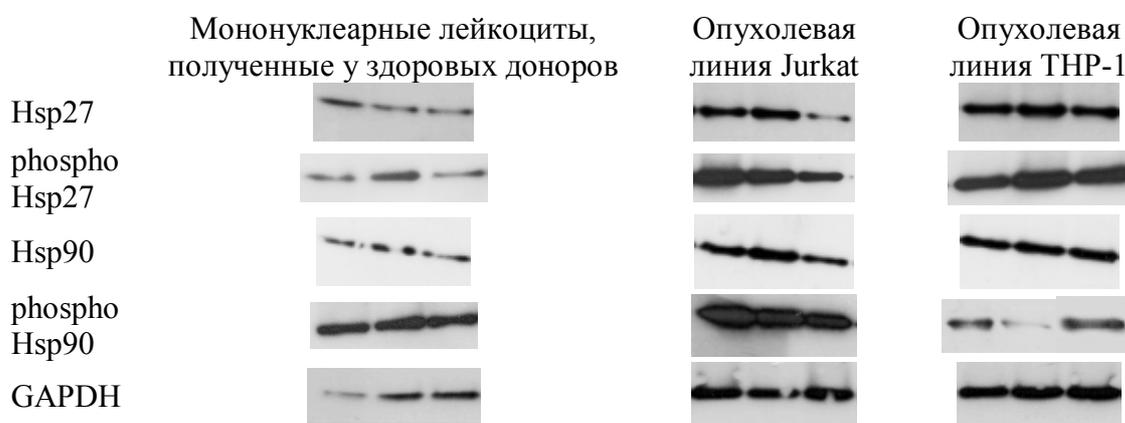


Рис. 1. Содержание белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 и их фосфорилированных форм в мононуклеарных лейкоцитах, опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 методом вестерн-блоттинга

Было установлено, что внутриклеточное содержание конститутивного белка Hsp90 во всех исследованных клеточных культурах не различалось ($p > 0,05$; рис. 2B), в то время как уровень белка Hsp27 в лизатах опухолевых клеток превышал его содержание в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров более, чем в 2 раза ($p < 0,05$; рис. 2A).

Для белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 показана важная роль фосфорилирования в выполнении их функции [Zhao Y.G. et al., 2001; Hollander

J.M. et al., 2004]. В связи с этим нами было проанализировано содержание фосфорилированных форм данных белков в опухолевых клетках и мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров. Оказалось, что в опухолевых клетках содержание фосфо-Hsp27 в 2 раза превышало его уровень в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров ($p < 0,05$; рис. 2Б). Уровень фосфорилированной формы Hsp90 в лизатах мононуклеарных лейкоцитов, напротив, превышал его содержание в опухолевых клетках ($p < 0,05$; рис. 2Г). Следует отметить, что представленные нами данные согласуются с результатами, полученными М. Kurokawa et al. [2008], которые продемонстрировали, что Hsp90 β в лейкозных клетках присутствует в гипофосфорилированной форме. Таким образом, опухолевые клетки линий Jurkat и ТНР-1 характеризуются снижением уровня фосфорформы белка Hsp90 и более высоким внутриклеточным содержанием белка теплового шока Hsp27 и его фосфорилированных форм.

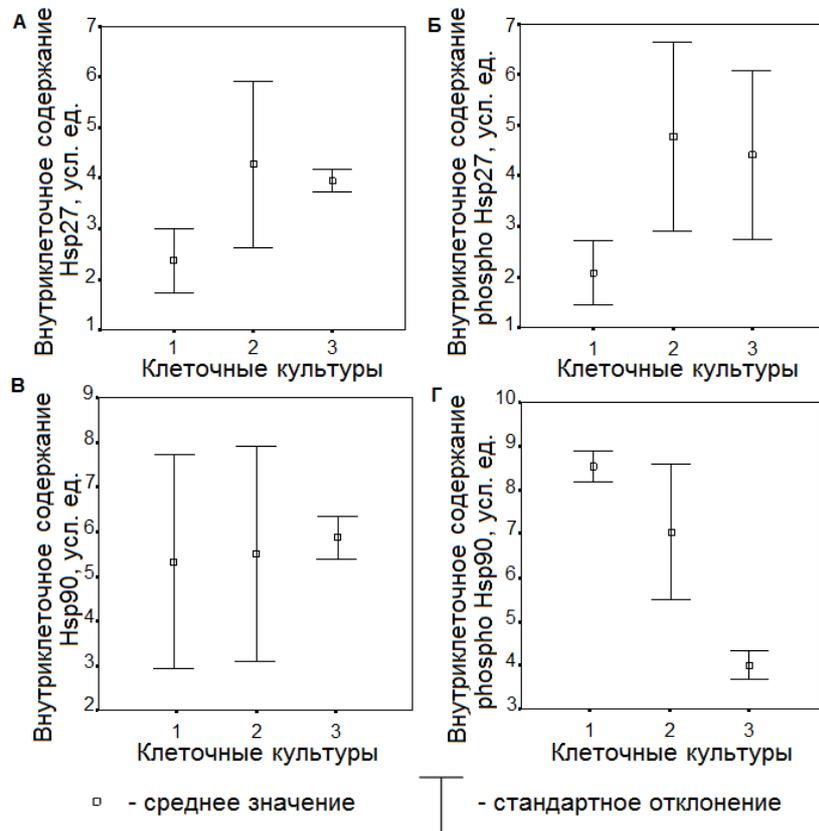


Рис. 2. Внутриклеточное содержание белков теплового шока Hsp27, Hsp90 и их фосфорилированных форм в лизатах: 1 – мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров; 2 – опухолевые клетки линии Jurkat; 3 – опухолевые клетки линии ТНР-1

В последнее время активно обсуждается вопрос об использовании ингибиторов белков теплового шока в лечении таких онкологических заболеваний, при которых отмечается повышенная экспрессия данных шаперонов, по сравнению с нетрансформированными клетками. Например, сообщается, что применение специфических ингибиторов Hsp90 может быть использовано для лечения пациентов, страдающих раком пищевода,

немелкоклеточным раком легких и миелоидной лейкемией [Russell J.S. et al., 2003; Wu X. et al., 2009; Trepel J. et al., 2010]. В нашем исследовании также были подтверждены селективность действия и высокая эффективность использования ингибиторов белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 для индукции апоптоза в клетках опухолевых линий Jurkat и THP-1 ($p < 0,05$; рис. 3, 4Б, 4В).

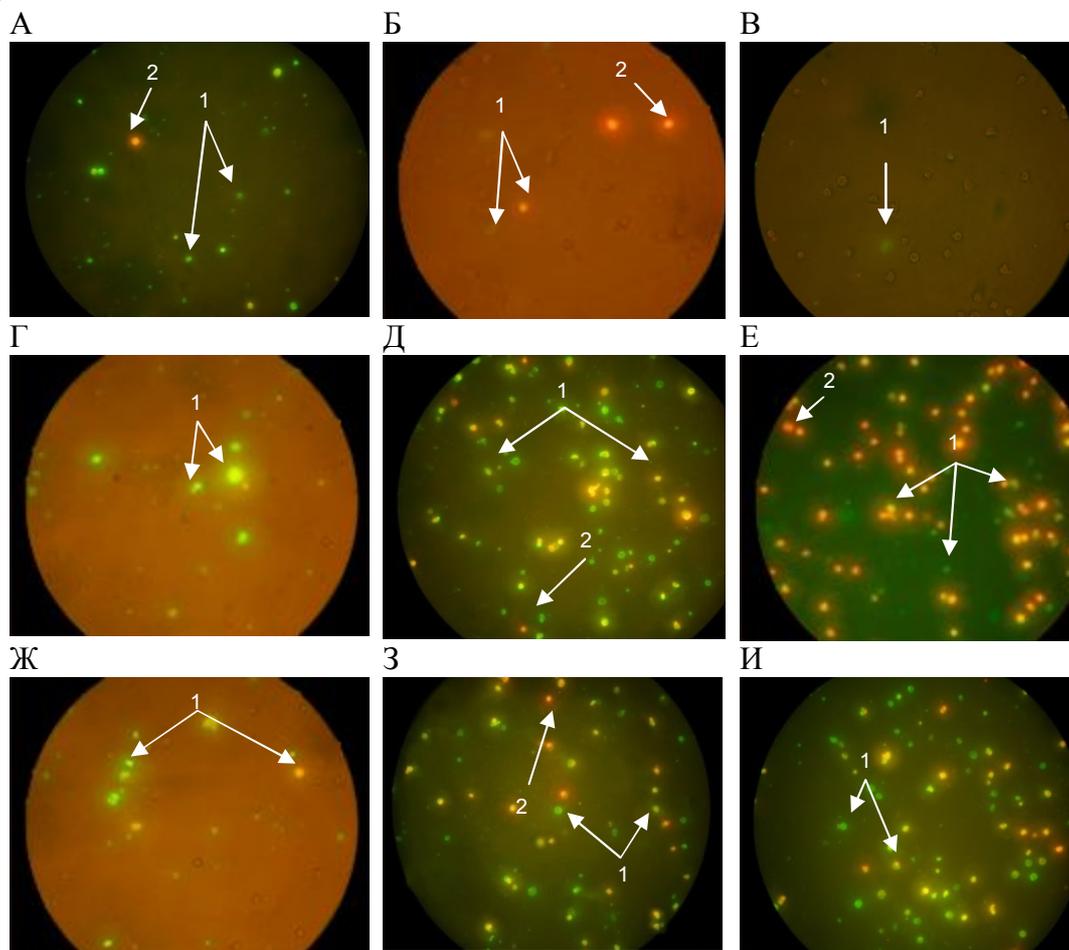


Рис. 3. Культуры мононуклеарных лейкоцитов (А, Г, Ж) и опухолевых клеточных линий Jurkat (Б, Д, З), THP-1 (В, Е, И) при различных условиях культивирования *in vitro* (флуоресцентная микроскопия, ув. 400)

Примечание: А, Б, В – интактные культуры; Г, Д, Е – при культивировании с ингибитором 17-ААГ (5 мкМ); Ж, З, И – при культивировании с ингибитором KRIBB3 (0,01 мкМ); 1 – клетки, находящиеся в апоптозе (FITC+/PI–, FITC+/PI+); 2 – клетки, находящиеся в некрозе (FITC–/PI+)

Наряду с высокой гибелью путем апоптоза опухолевых клеток, было обнаружено, что ингибирование Hsp27 и Hsp90 не вызывало увеличение числа погибших клеток в культуре мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров ($p > 0,05$; рис. 4А).

Мы также провели оценку апоптотически измененных клеток при индукции апоптоза дексаметазоном и в условиях ингибирования белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 при добавлении в инкубационную среду дексаметазона. Совместное использование ингибитора белка теплового шока Hsp27 и дексаметазона приводило к значительному возрастанию гибели

опухолевых клеток путем апоптоза ($p < 0,05$); при этом количество мононуклеарных лейкоцитов, вступивших в апоптоз, не отличалось от контрольных значений ($p > 0,05$; рис. 4А). При ингибировании Hsp90 с последующей индукцией апоптоза в клетках опухолевой линии ТНР-1 отмечался рост числа апоптотически измененных клеток, по сравнению с интактными клетками, однако их число было меньше, чем при использовании ингибитора 17-ААG ($p < 0,05$; рис. 4В). Вместе с тем применение сочетания ингибитора Hsp90 и дексаметазона в среде культивирования клеток линии Jurkat так же, как и в случае совместного использования Hsp27 и дексаметазона, сопровождалось максимальным увеличением числа погибших клеток, по сравнению с интактной культурой и при использовании *in vitro* только ингибитора или только дексаметазона ($p < 0,05$; рис. 4Б).

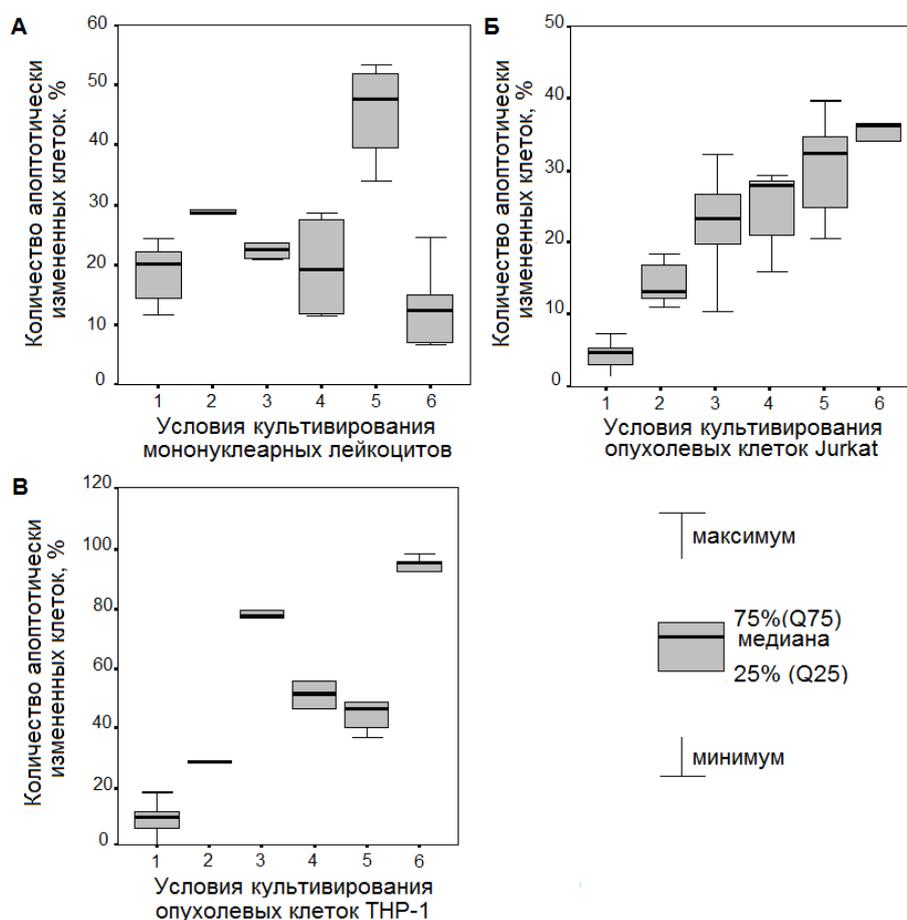


Рис. 4. Количество апоптотически измененных клеток в мононуклеарных лейкоцитах (А) и культурах клеток опухолевых линий Jurkat (Б), ТНР-1 (В)

Примечание здесь и в рис. 5,6,7: 1 – интактные клетки; 2 – культивирование с дексаметазоном (0,01 мкМ); 3 – культивирование с 17-ААG (5 мкМ); 4 – культивирование с KRIBB3 (0,1 мкМ); 5 – культивирование с дексаметазоном и 17-ААG; 6 – культивирование с дексаметазоном и KRIBB3

Далее мы оценили вклад ингибиторов белков Hsp27 и Hsp90 и их совместного действия с дексаметазоном на механизмы реализации рецепторного пути апоптоза. Оказалось, что количество опухолевых клеток ТНР-1 и Jurkat, презентующих FasR и TNF-R1, значительно выше, чем в

культуре мононуклеарных лейкоцитов ($p < 0,05$; рис. 5, 6). Известно, что опухоли, у которых на клеточной поверхности презентуется достаточное количество полноценных FasR, уязвимы для цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако в этом случае защита опухоли от апоптоза связана с повышенной экспрессией генов как мембраносвязанных, так и растворимых форм FasL [Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В., 2002; Smyth M.J. et al., 2005; Naumnik W. et al., 2007]. В нашем исследовании практически 100% опухолевых клеток Jurkat (96,10(93,00-96,85)%) и ТНР-1 (99,20(98,95-99,75)%) несли на своей поверхности FasL, продукция растворимой формы TNF- α в опухолевых клеточных культурах Jurkat и ТНР-1 была намного ниже, чем в культуре мононуклеарных лейкоцитов ($p < 0,05$). Содержание растворимой формы TNF-R1 в опухолевых клетках линии ТНР-1 и мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у здоровых доноров было достоверно выше, чем в супернатантах клеточной культуры Jurkat ($p < 0,05$).

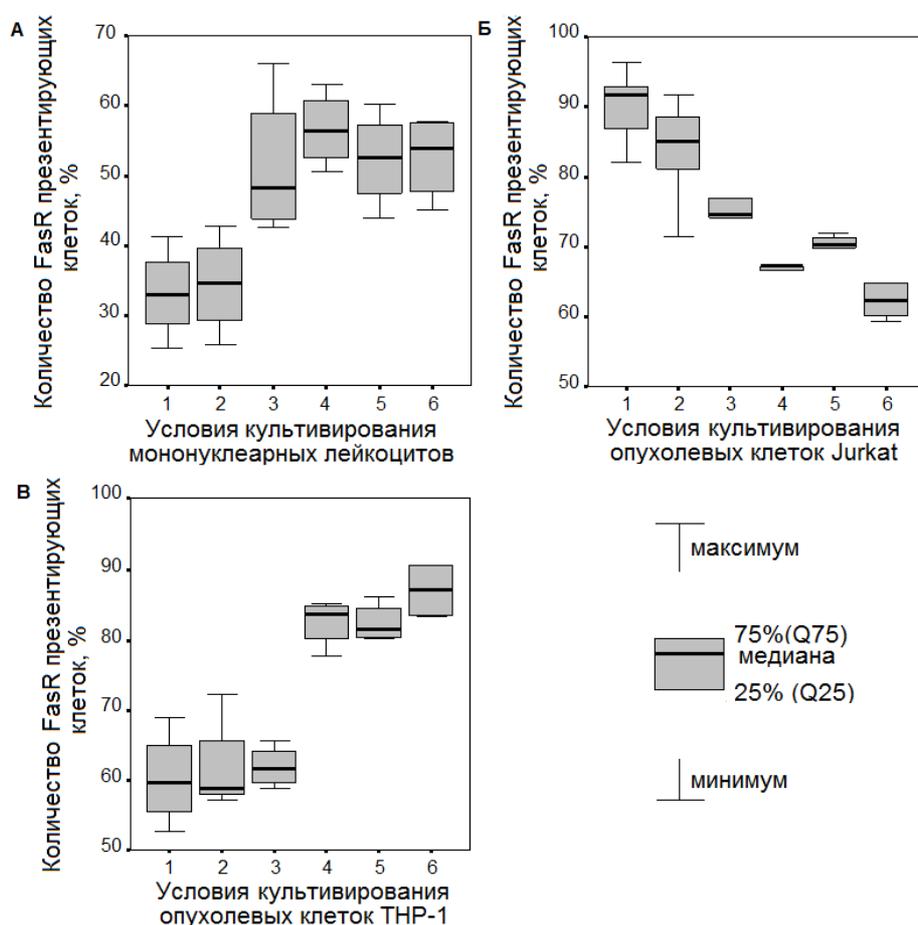


Рис. 5. Количество FasR презентующих клеток в культурах опухолевых линий Jurkat (Б), ТНР-1 (В) и мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров (А)

В дальнейшем нами проводилось исследование оценки влияния ингибиторов белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 на презентацию рецепторов TNF-R1 и FasR на поверхности клеток. Так, блокирование данных шаперонов в мононуклеарных лейкоцитах не приводило к изменению количества клеток, презентующих на своей поверхности TNF-R1 ($p > 0,05$; рис. 6А), и, напротив, увеличивало количество FasR-положительных клеток ($p < 0,05$; рис. 5А).

Несмотря на это, в мононуклеарных лейкоцитах не было зафиксировано увеличение количества клеток, вступивших в апоптоз. В противоположность этому, в опухолевой линии Jurkat при ингибировании белков теплового шока, а также при их совместном действии с дексаметазоном отмечалась индукция апоптоза. Однако увеличение TNF-R1-презентирующих клеток было зарегистрировано только при блокировании Hsp90 ($p < 0,05$; рис. 6А), тогда как ингибирование Hsp27 существенным образом не изменяло количество клеток, презентующих на своей поверхности TNF-R1 ($p > 0,05$; рис. 6Б). Количество FasR на поверхности клеток опухолевой линии Jurkat при ингибировании белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 даже уменьшалось ($p < 0,05$; табл. 5Б).

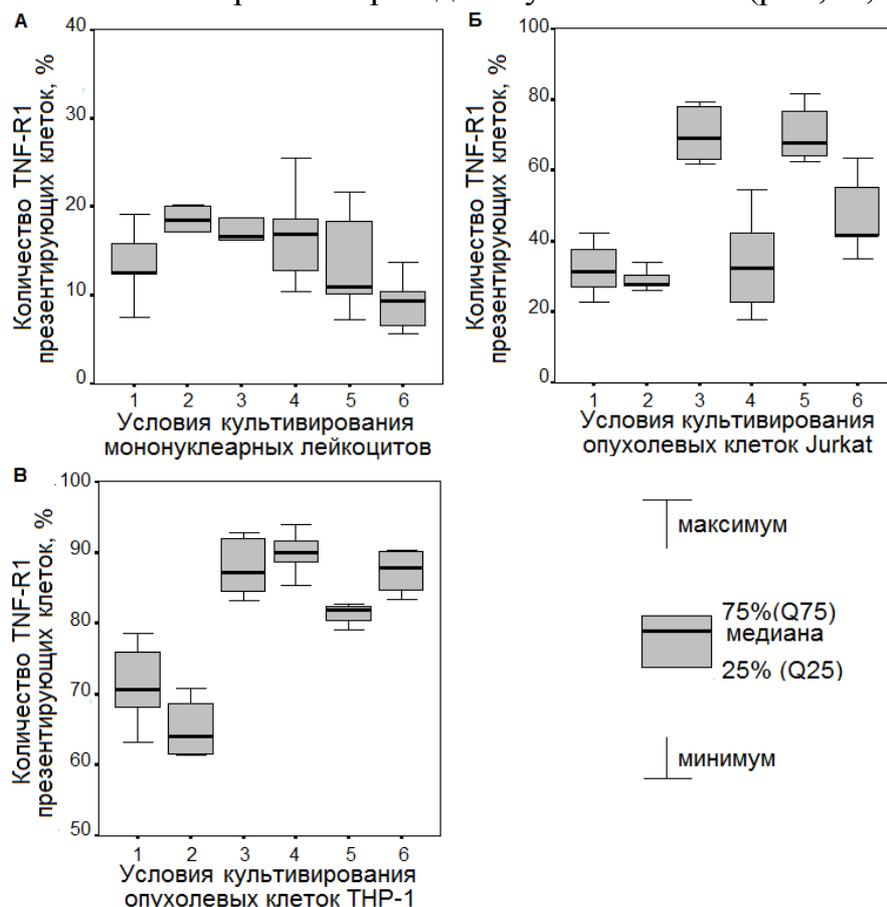


Рис. 6. Количество TNF-R1 позитивных клеток в культурах опухолевых линий Jurkat (Б), THP-1 (B) и мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров (А)

Одним из возможных механизмов увеличения количества опухолевых клеток, презентующих на своей поверхности TNF-R1 при блокировании Hsp90 в клетках линии Jurkat, является активация p53, который индуцирует экспрессию проапоптотических генов семейства bcl-2, ингибиторов циклинзависимых протеинкиназ (p21, p27) и рецепторов семейства TNF [Özögen N., El-Deiry W.S., 2003; Мойбенко А.А. и соавт., 2005].

В опухолевых клетках THP-1 культивирование *in vitro* с ингибиторами Hsp27 и Hsp90 и их сочетании с дексаметазоном сопровождалось значительным увеличением числа TNF-R1- и FasR-презентирующих клеток, а также количества опухолевых клеток, вступивших в апоптоз ($p < 0,05$; рис. 5Б, 6В, 4В).

Полученные данные свидетельствуют о возможности реализации рецепторного пути апоптоза в опухолевых клетках ТНР-1 при ингибировании белков Hsp27 и Hsp90. Однако механизмы, участвующие в презентации рецепторов TNF-R1 и FasR на поверхности опухолевых клеток ТНР-1, не ясны.

Наряду с увеличением числа опухолевых клеток, несущих на своей поверхности рецепторы FasR и TNF-R1, ингибирование белков Hsp27 и Hsp90 и их совместное действие с дексаметазоном не изменяло, а в ряде случаев даже уменьшало количество растворимых TNF- α , sTNF-R1 и мембраносвязанных FasL.

После взаимодействия FasR и TNF-R1 со своими лигандами происходит активация цитоплазматических «доменов смерти» и адапторных белков, ведущих к образованию активной формы каспазы-8 [Жижина Г.П., 2002; Tibbetts M.D. et al., 2003; Lavrik I. et al., 2005]. Показано, что каспаза-8 при некоторых видах опухолей не экспрессируется или инактивируется [Shivapurkar N. et al., 2002; Soung Y.H. et al., 2005; Soung Y.H. et al., 2005; Fulda S. et al., 2006]. В то же время существуют данные, которые демонстрируют сверхэкспрессию каспазы-8 в клетках некоторых типов рака, например, клетках опухолей толстой и прямой кишки, поджелудочной железы, рака молочной железы [Vakkala M. et al., 1999; Heijink D.M. et al., 2007; Xu B. et al., 2008].

Нами был установлен более высокий уровень каспазы-8 в лизатах опухолевых клеток Jurkat и ТНР-1 (0,30(0,27-0,33) и 0,44(0,37-0,52) нг/мл, соответственно), по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров (0,12(0,08-0,14) нг/мл). При индукции апоптоза с применением дексаметазона мы зарегистрировали достоверное увеличение содержания каспазы-8 в супернатантах мононуклеарных лейкоцитов и опухолевых клетках линии Jurkat ($p < 0,05$).

Применение *in vitro* ингибитора Hsp90 (17-ААG), а также его сочетание с дексаметазоном приводило к достоверному увеличению содержания каспазы-8 как в опухолевых клетках Jurkat и ТНР-1 ($p < 0,05$), так и в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров ($p < 0,05$). При блокировании белка теплового шока Hsp27 и совместном действии его ингибитора с дексаметазоном также, как и в случае внесения в культуральную среду 17-ААG, отмечалось увеличение значений уровня каспазы-8 в супернатантах опухолевых клеток и мононуклеарных лейкоцитов ($p < 0,05$). Однако только в культурах опухолевых клеток Jurkat и ТНР-1 увеличение уровня каспазы-8 в дальнейшем сопровождалось развитием апоптоза, что еще раз подтверждает важную роль белка Hsp90 в модуляции апоптоза опухолевых клеток.

Наряду с экспрессией генов каспазы-8, инициация рецепторного пути апоптоза имеет значение в активации NF- κ B. Оценка базового содержания NF- κ B в лизатах опухолевых клеток Jurkat и ТНР- и мононуклеарных лейкоцитов (15,99 \pm 2,70; 13,08(11,50-15,80) и 15,25(13,30-20,94) усл. ед., соответственно), проведенная в нашем исследовании, не выявила достоверных различий в изучаемых клеточных культурах ($p > 0,05$).

В нашем исследовании мы обнаружили повышение содержания транскрипционного фактора NF- κ B в лизатах опухолевых клеток линий ТНР-1 и мононуклеарных лейкоцитов при добавлении в культуральную среду дексаметазона ($p < 0,05$). Схожие результаты были получены R.K. Strair et al. [2008] при изучении действия дексаметазона на транскрипционный фактор NF- κ B у больных, страдающих острым миелобластным лейкозом.

Внесение в среду культивирования опухолевых клеток Jurkat и ТНР-1 ингибитора Hsp27 приводило к значительному увеличению содержания транскрипционного фактора NF- κ B ($24,88 \pm 2,50$ и $48,10(25,20-54,39)$ усл. ед., соответственно, $p < 0,05$). Вероятно, это связано с тем, что в культурах клеток Jurkat и ТНР-1, как и в клетках скелетных мышц [S.L. Dodd et al. 2009], кератиноцитах [Sur R. et al. 2008], клетках линии HeLa [Park K.J. et al. 2003], белок теплового шока Hsp27 выступает в качестве негативного регулятора NF- κ B. Фосфорилированный белок Hsp27 угнетает фосфорилирование комплекса IKK β , который, в свою очередь, уменьшает фосфорилирование I κ B α , что в итоге приводит к угнетению ядерной транслокации NF- κ B [Bhattacharyya S. et al., 2009]. В мононуклеарных лейкоцитах, в отличие от опухолевых клеток, при культивировании с ингибитором белка Hsp27 транскрипционный фактор NF- κ B отсутствовал. Вероятно, это связано с тем, что в нетрансформированных клетках крови белок Hsp27, также как и в клеточных линиях U937, MEF и REG, принимает активное участие в активации NF- κ B, а его отсутствие препятствует запуску NF- κ B -пути [Parcellier A. et al., 2003].

При действии на клетки мононуклеарных лейкоцитов и опухолевых культур Jurkat и ТНР-1 ингибитора Hsp90 было зарегистрировано увеличение величины содержания транскрипционного фактора NF- κ B ($p < 0,05$).

В нашем исследовании при ингибировании белков Hsp27 и Hsp90 отмечалось повышение внутриклеточного содержания NF- κ B, а также увеличение количества опухолевых клеток, вступивших в апоптоз. В связи с этим мы высказали предположение, что транскрипционный фактор NF- κ B при ингибировании белков Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 участвует в экспрессии проапоптотических генов.

При ингибировании белков Hsp27 и Hsp90 в сочетании с дексаметазоном в культуре опухолевых клеток линии ТНР-1 и при совместном действии дексаметазона и ингибитора белка теплового шока Hsp90 в опухолевых клетках линии Jurkat нами были получены более низкие значения содержания транскрипционного фактора NF- κ B и, по сравнению с действием на опухолевые клетки только ингибиторов ($p < 0,05$). Данный факт может быть обусловлен тем, что глюкокортикоиды участвуют в ингибировании активности NF- κ B, взаимодействуя с субъединицами NF- κ B, индуцируя экспрессию I κ B α , а также посредством конкуренции за коактиваторы [Lin B. et al. 1999; Tago K. et al. 2004].

Таким образом, подводя итог проведенного нами исследования, следует отметить, что в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 белки теплового шока Hsp27 и Hsp90 вовлечены в блокирование рецепторного пути апоптоза на

различных его этапах (рис. 7). В условиях селективного ингибирования данных белков отмечалось значительное увеличение доли апоптотически измененных опухолевых клеток за счет увеличения презентации мембранных рецепторов TNF-R1 и FasR в опухолевой линии ТНР-1 и увеличение числа TNF-R1 в клетках опухолевой линии Jurkat, повышения содержания инициаторной каспазы-8 в супернатантах опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1 и активации NF- κ B.

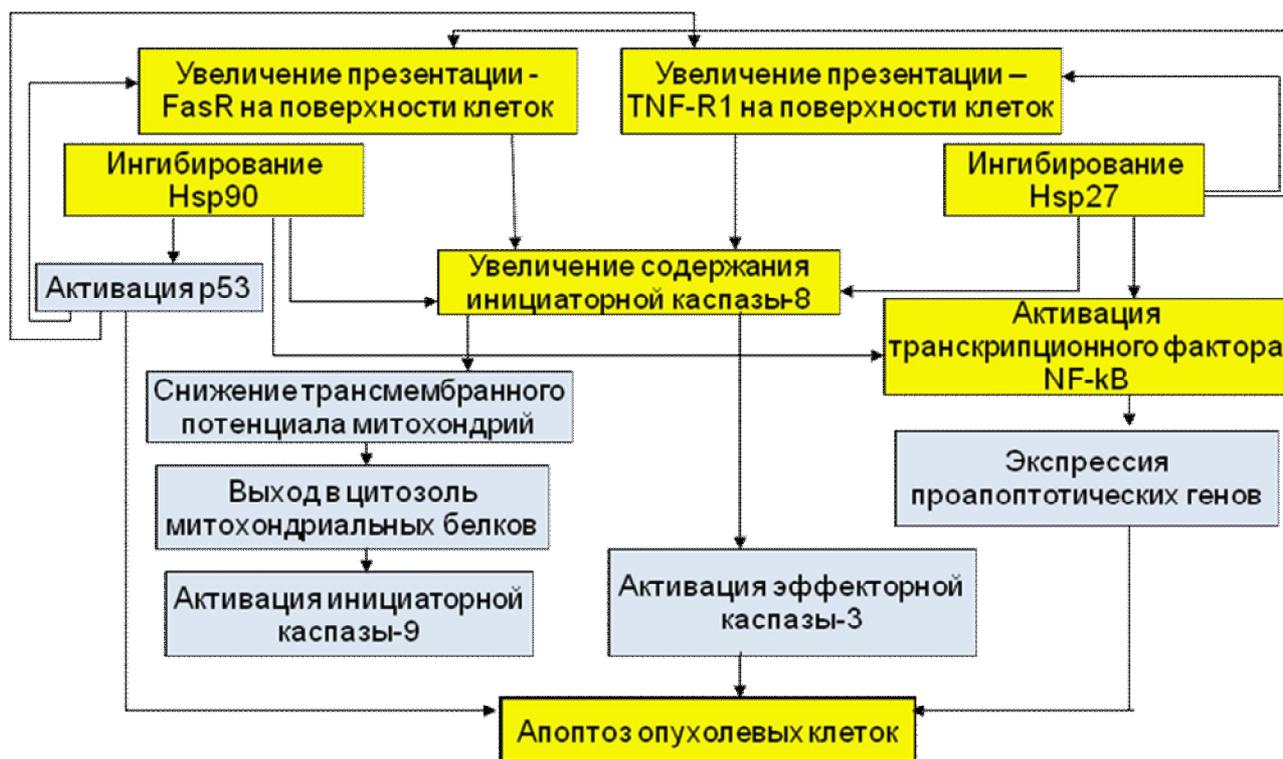


Рис. 7. Механизмы развития апоптоза при ингибировании белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 [по данным N. Özören, W.S. El-Deiry, 2003; А.А. Мойбенко и соавт., 2005; Н.М. Веере, 2005; R. Arya et al., 2007; D. Lanneau et al., 2008; и результатам собственных исследований (выделено желтым цветом)]

ВЫВОДЫ

1. Реализация антиапоптотического эффекта белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в клетках опухолевых линий Jurkat и ТНР-1 опосредуется ингибированием Fas- и TNF-зависимых путей регуляции апоптоза.

2. Механизмы блокирования рецепторного пути апоптоза белками теплового шока Hsp27 и Hsp90 сопряжены с модуляцией Fas-системы. В условиях селективного ингибирования белка теплового шока Hsp27 *in vitro* с использованием KRIBB3 в опухолевой линии ТНР-1 возрастает число FasR-позитивных и уменьшается количество FasL⁺-клеток; в линии Jurkat снижается количество клеток, презентующих FasR и FasL. Применение селективного ингибитора белка теплового шока Hsp90 –17-AAG *in vitro* приводит к

снижению количества клеток опухолевой линии Jurkat, несущих FasR и FasL на мембране, но не изменяет их числа в опухолевой линии ТНР-1.

3. В опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 белки теплового шока Hsp27 и Hsp90 вовлечены в регуляцию компонентов TNF-системы: в клетках линии ТНР-1 селективное ингибирование *in vitro* как белка теплового шока Hsp27, так и Hsp90 приводит к снижению продукции TNF α , увеличению количества клеток, презентующих TNF-R1; в клеточной линии Jurkat продукция TNF α уменьшается при действии ингибиторов белков теплового шока Hsp27 и Hsp90, количество TNF-R1-позитивных клеток возрастает только при селективном ингибировании белка теплового шока Hsp27.

4. В условиях ингибирования белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 (KRIBB3 и 17-AAG, соответственно) в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 *in vitro* увеличивается содержание инициаторной каспазы-8, что свидетельствует о вовлеченности этого компонента регуляторной системы апоптоза в процесс его блокирования с участием шаперонов Hsp27 и Hsp90.

5. Механизмы ингибирующего действия белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 на апоптоз опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 сопряжены со снижением содержания транскрипционного фактора NF-kB.

6. В клетках опухолевых линий Jurkat и ТНР-1 ингибирование FasR- и TNF-R1-опосредованных путей апоптоза сопровождается уменьшением содержания фосфорилированной формы белка Hsp90, а также увеличением внутриклеточного содержания белка теплового шока Hsp27 и его фосфорилированных форм.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Роль белка теплового шока 90 в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток Jurkat / Е.В. Кайгородова, **М.В. Белкина**, А.Н. Марошкина, А.П. Зима // Актуальные проблемы медицины: Материалы XII межрегиональной, научно-практической конференции, г. Абакан, 3-4 июня 2009. – Абакан, 2009. – С. 242-243.

2. Дисбаланс белков семейства BCL-2 в модуляции апоптоза лимфоцитов / А.Н. Марошкина, О.Е. Чечина, О.Б. Жукова, Н.В. Рязанцева, Т.С. Прохоренко, А.К. Биктасова, **М.В. Белкина**, Е.В. Сазонова, А.П. Зима, Т.Т. Радзивил // Рецепция и внутриклеточная сигнализация: Материалы международной конференции, г. Пущино, 2-4 июля 2009. – Пущино, 2009. – С. 457-461.

3. Механизмы нарушения митохондриального пути апоптоза / А.Н. Марошкина, **М.В. Белкина**, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева, А.П. Зима, Т.Т. Радзивил // Науки о человеке: Материалы X конгресса молодых ученых и специалистов, г. Томск, 28-29 мая 2009. – Томск, 2009. – С. 88-89.

4. Эффект ингибитора белка теплового шока 90 17-AAG на TNF- α индуцированный апоптоз опухолевых клеток линии Jurkat / В.Д. Якушина, **М.В. Белкина**, А.Н. Марошкина, Е.В. Коновалова, Е.В. Кайгородова // Актуальные проблемы патофизиологии: Материалы XVI межгородской конференции молодых ученых, г. Санкт-Петербург, 21-22 апреля 2010. – Санкт-Петербург, 2010. – С. 97-98.

5. Влияние ингибитора белка теплового шока Hsp27 и дексаметазона на апоптоз опухолевых клеток линии Jurkat / **М.В. Белкина**, Е.В. Кайгородова, А.Н. Марошкина, В.Д. Якушина, Е.В. Коновалова // Актуальные вопросы медицинской науки: Сборник научных работ студентов и молодых ученых Всероссийской научно-практической конференции с

международным участием, посвященной 1000-летию г. Ярославля, г. Ярославль, 21-23 апреля 2010. – Ярославль, 2010. – С. 314.

6. Реализация апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat при действии ингибиторов белков теплового шока 90 и 27 / Е.В. Кайгородова, А.Н. Марошкина, **М.В. Белкина**, В.Д. Якушина, Е.В. Коновалова // Актуальные проблемы медицины: Материалы XIII межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, г. Абакан, 4-5 мая 2010. – Абакан, 2010. – С. 256-258.

7. Действие ингибитора белка теплового шока HSP90 на активность каспазы-3 в опухолевых клетках линии Jurkat / **М.В. Белкина**, А.Н. Марошкина, Е.В. Кайгородова, В.Д. Якушина, Е.В. Коновалова // Материалы IV международной конференции молодых ученых-медиков, г. Курск, 25-26 февраля 2010. – Курск, 2010. – С. 80-81.

8. The role of transcriptional factors p53 and NF- κ B in the induction apoptosis during the oxidative stress in vitro / Л.А. Клепцова, И.С. Лосенков, Е.Г. Старикова, Е.В. Кайгородова, **М.В. Белкина** // Материалы V международной (XIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, г. Москва, 18 марта 2010. – Москва, 2010. – С. 436.

9. Apoptosis induction in tumor cells by inhibitors heat shock proteins and dexametasone / А.Н. Марошкина, **М.В. Белкина**, Е.В. Кайгородова, В.Д. Якушина., Е.В. Коновалова // Материалы V международной (XIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, г. Москва, 18 марта 2010. – Москва, 2010. – С. 438.

10. Особенности лекарственно-индуцированного апоптоза опухолевых клеток в условиях ингибирования белков теплового шока HSP27 и HSP90 /А. Н. Марошкина, Е.В. Кайгородова, **М.В. Белкина**, В.Д. Якушина, Л.А. Клепцова, А.П. Зима // Фундаментальные и прикладные исследования в медицине: Материалы III общероссийской научной конференции, г. Сочи, 22-25 сентября 2010. – Сочи, 2010. – С. 49-50.

11. Особенности реализации апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов крови здоровых доноров в условиях ингибирования белка теплового шока 27 кДа in vitro / Е.В. Кайгородова, А.Н. Марошкина, **М.В. Белкина**, Е.В. Коновалова, В.Д. Якушина, Л.А. Клепцова // Медицинский академический журнал: Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», посвященная 120-летию со дня основания НИИЭМ СЗО РАМН г. Санкт-Петербург, 21-22 декабря 2010. – Санкт-Петербург, 2010. – С. 15.

12. Митохондриальный путь апоптоза: роль Hsp27 в опухолевых клетках линии Jurkat / А.Н. Марошкина, **М.В. Белкина**, Е.В. Кайгородова, А.П. Зима // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине: материалы первой международной научно-практической конференции, г. Санкт-Петербург, 23-26 ноября, 2010. – Санкт-Петербург, 2010. – С. 72-73.

13. Effects of inhibitors heat shock proteins 90 and 27 on etoposide-induced apoptosis of tumor cells / Е. Kaygorodova, N. Ryazantseva, V. Novitsky, **M. Belkina**, A. Maroshkina // The 6th International Congress of Pathophysiology «Gene-environment interaction in health and disease» Montreal (Canada), 22-25 September, 2010. – Montreal (Canada), 2010. – P.69-70.

14. Исследование механизмов модуляции апоптоза Т-лимфоцитов / В.Д. Якушина, **М.В. Белкина**, А.Н. Марошкина, Е.В. Кайгородова, О.А. Васильева // Актуальные проблемы медицины: материалы 14-ой межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, г. Абакан, 27-28 апреля, 2011. – Абакан, 2011. – С. 262-265.

15. Влияние белков теплового шока на NF- κ B-опосредованный сигнальный путь опухолевых клеток / Е.В. Кайгородова, **М.В. Белкина**, А.Н. Марошкина, М.В. Клименченко, Е.А. Черкасова // Актуальные проблемы медицины: материалы 14-ой межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, г. Абакан, 27-28 апреля, 2011. – Абакан, 2011. – С. 250-253.

16. Апоптозмодулирующие эффекты белка теплового шока 90 кДа в опухолевых клетках / Е.В. Кайгородова, **М.В. Белкина**, А.Н. Марошкина, Е.А. Черкасова, М.А. Клименченко // Проблемы и перспективы современной науки: материалы 4-ой международной телеконференции «Фундаментальные науки и практика», г. Томск, 24-29 октября 2011. – Томск, 2011. – Т. 3, №1. – С. 63-64.
17. Роль Hsp90 в продукции TNF- α , экспрессии TNF-R1 при дексаметазон-индуцированном апоптозе опухолевых клеток линии Jurkat / М.В. Клименченко, Е.А. Черкасова, **М.В. Белкина**, А.Н. Марошкина, Е.В. Кайгородова, А.П. Зима // Вестник РГМУ: материалы VI международной научной Пироговской медицинской конференции студентов и молодых ученых, г. Москва, 24 марта, 2011. – Москва, 2011. – №1. – С. 22-23.
18. Функциональные взаимоотношения шаперона Hsp27 и белков семейства Bcl-2 в опузольных клетках ТНР-1 / Е.А. Черкасова, А.Н. Марошкина, **М.В. Белкина**, М.В. Клименченко, Е.В. Кайгородова // Материалы международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», г.Пушино, 24-26 мая 2011. – Пушино, 2011. – С. 630-635.
19. Белок теплового шока 90 кДа – молекулярная мишень для коррекции апоптоза опухолевых клеток / Е.В. Кайгородова, А.Н. Марошкина, **М.В. Белкина**, Е.А. Черкасова, М.В. Клименченко // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – Приложение № 1. – С. 58-59.
20. Молекулярные участники рецепторного пути регуляции апоптоза в опухолевых и нормальных лимфоцитах в условиях ингибирования белка теплового шока 90 in vitro / Н.В. Рязанцева, Е.В. Кайгородова, В.В. Новицкий, **М.В. Белкина**, А.Н. Марошкина, М.В. Клименченко, Л.А. Таширева // **Сибирский онкологический журнал**. – 2011. – Т.44, №2. – С. 52-56.
21. Суперсемейство рецептора фактора некроза опухоли а и белок теплового шока Hsp90: молекулярные основы взаимоотношения / Е.В. Кайгородова, **М.В. Белкина**, А.Н. Марошкина, О.Е. Чечина, А.П. Зима, В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева // **Медицинская иммунология**. – 2011. – Т. 13, № 2/3. – С. 247-252.
22. Белок теплового шока 90 - модулятор ФНО α -индуцированного апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat / Е.В. Кайгородова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, А.Н. Марошкина, **М.В. Белкина**, В.Д. Якушина // **Вестник Российской Академии медицинских наук**. – 2011. – №8. – С. 3-6.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 17-AAG (17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin) – ингибитор Hsp90
 FasL (CD95L, Apo-1L, CD178) – Fas-лиганд
 FasR (CD95/Apo1) – Fas-рецептор
 FLIP (FLICE-like inhibitory protein) – FLICE-ингибирующий белок
 Hsp (heat shock protein) – белок теплового шока
 ИКК (I κ B kinase) – I κ B киназный комплекс
 Jurkat – клеточная линия Т-лимфобластного лейкоза человека
 KRIBB3 (5-(5-Ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-ethoxyphenyl)isoxazole) – ингибитор Hsp27
 NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – ядерный фактор κ B
 sTNF (soluble tumor necrosis factor) – растворимая форма фактора некроза опухоли
 ТНР-1 – клеточная линия промиелоцитарной лейкемии человека
 TNF-R (tumor necrosis factor receptor) – рецепторы фактора некроза опухоли
 TNF- α (tumor necrosis factor α) – фактор некроза опухоли альфа