

На правах рукописи

НОСАРЕВА
Ольга Леонидовна

**Роль окислительной модификации белков и их деградации,
тиолдисульфидной системы в механизмах дисрегуляции апоптоза при
опухолевой прогрессии**

14.03.03 – патологическая физиология
03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

ТОМСК – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор

Рязанцева Наталья Владимировна

доктор медицинских наук, профессор

Степовая Елена Алексеевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фундаментальной медицины и гигиены Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова» (Республика Хакасия, г. Абакан) **Агеева Елизавета Сергеевна**

доктор медицинских наук, руководитель лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр экспериментальной и клинической медицины» (г. Новосибирск) **Меньщикова Елена Брониславовна**

доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии опухолей Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (г. Томск) **Кондакова Ирина Викторовна**

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 по защите диссертаций при ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России по адресу 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте www.ssmu.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время злокачественные новообразования занимают одну из ведущих позиций среди социально-значимых патологий, характеризующихся высокой заболеваемостью и смертностью (Каприн А.Д. и др., 2015). Известно, что в основе патогенеза ряда патологических процессов, в том числе опухолевого роста, лежат развитие окислительного стресса (ОС) и нарушение механизмов регуляции апоптоза, приводящие к «ускользанию» клеток от запрограммированной гибели (Меньщикова Е.Б. и др., 2008; Engler I. et al., 2009; Boland M.L. et al., 2013; Green D.R. et al., 2014). Одним из перспективных подходов решения этой проблемы является поиск редокс-зависимых молекулярных мишеней регуляции апоптоза.

Причинно-следственные связи между редокс-балансом клетки, активностью белков-эффекторов и белков-регуляторов, определяющих состояние клеточного метаболизма и функций, остаются большей частью неопределенными. Модуляция конформации белковых молекул представляет собой молекулярную технологию регуляции активности протеинов и биохимических процессов в клетках (Lu J., Holmgren A., 2012; Hampton M.B., O'Connor K.M., 2016). Большой интерес представляет возможность влияния с помощью компонентов тиолдисульфидной системы, окислительной модификации белков (ОМБ) и их деградации на различные физиологические и патологические процессы, в частности апоптоз нормальных и опухолевых клеток. В связи с этим, на сегодняшний день представляется крайне актуальным исследование роли и молекулярных механизмов глутатионилирования, убиквитинилирования белков в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток.

Степень разработанности. Актуальными являются работы по изучению регуляции апоптоза, инициируемого эндогенными или экзогенными воздействиями. Показано, что при патологиях различного генеза, сопровождающихся развитием ОС, в том числе и при опухолевом росте, активные формы кислорода (АФК), помимо универсальных клеточных повреждающих агентов, могут выступать в роли модуляторов программы клеточной гибели (Зенков Н.К. и др., 2009; Рязанцева Н.В. и др., 2010; Landry W.D., Cotter T.G., 2014; Lodhi I.J., Semenkovich C.F., 2014; Lennicke C. et al., 2015).

В поддержание редокс-баланса клетки существенный вклад вносит тиолдисульфидная система. Важнейшими ее компонентами являются восстановленный глутатион (GSH) и тиоредоксин, которые способны снижать деструктивное и цитотоксическое действие АФК, выступая акцепторами гидроксильного радикала и синглетного кислорода (Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 2010; Степовая Е.А. и др., 2010; Hanschmann E.M. et al., 2013; Lu J., Holmgren A., 2014), а также являются участниками внутриклеточной сигнальной трансдукции, редокс-регуляции активности транскрипционных факторов, экспрессии генов (Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В., 2007; Pastore A., Piemonte F., 2012; Sengupta R., Holmgren A., 2012; Dannenmann B. et al., 2015; Yama K. et al., 2015). Роль глутатиона во внутриклеточной редокс-регуляции опосредована образованием смешанных дисульфидов с тиоловыми группами протеинов (Allen E.M., Mieczal J.J., 2012; Hill B.G., Bhatnagar A., 2012). Тиоредоксин энзиматическим путем участвует в дитиоляции глутатионилированных белков (Hanschmann E.M. et al., 2013; Pader I. et

al., 2014). Для поддержания функционального состояния компонентов тиолдисульфидной системы необходимы сопряженные эффекты тиоредоксина, глутатиона и НАДФН-зависимых редуктаз (Hanschmann E.M. et al., 2013; Lu J., Holmgren A., 2014).

Накопление окислительно-модифицированных белков в результате развития ОС способствует активации протеасомного пути их деградации с участием убиквитина (Муравьева Л.Е. и др., 2010; Цимоха А.С., 2010; Lu L. et al., 2013; Cooper J.A. et al., 2015), а также индуцибельной наработке белков теплового шока (heat shock proteins – Hsp). Продемонстрировано, что факторы транскрипции могут изменять свою активность не только под влиянием компонентов редокс-чувствительных сигнальных систем, но и с помощью окислительной модификации. Шапероны участвуют в восстановлении нативной конформации белковых молекул и активности ферментов (Anelli T., Sitia R., 2008; Bakthisaran R. et al., 2015; Колегова Е.С. и др., 2016). Кроме того, они тесно взаимодействуют с компонентами антиоксидантной системы (Söti C., Csermely P., 2007), обладают анти- и проапоптотической функцией (Lianos G.D., 2015). В условиях ОС факторы транскрипции, ферменты антиоксидантной защиты и апоптоза нуждаются в своевременном рефолдинге для поддержания их активности. Согласно современным представлениям, белки семейства Hsp70, одними из первых реагируют на ОС, обладают свойствами ферментов, исправляющих конформационные изменения протеинов и способствуют трансмембранной транслокации белков. Процесс рефолдинга с помощью Hsp70 протекает более эффективно после ассоциации протеиновых агрегатов с белками теплового шока низкой молекулярной массы, в частности с Hsp27 (Haslbeck M. et al., 2005; Shuhong G. et al., 2007). Поэтому выяснение роли Hsp в рефолдинге и дизрегуляции апоптоза является актуальной задачей медицины и биологии. Несмотря на то, что ряд молекулярных мишеней регуляции апоптоза определен, роль и молекулярные механизмы участия тиолдисульфидной системы, ОМБ и их убиквитин-зависимой деградации в реализации запрограммированной гибели требуют дальнейшего изучения, так как они могут быть использованы для разработки способов управления апоптозом опухолевых клеток при злокачественных новообразованиях.

Цель исследования: установить молекулярные механизмы участия окислительно-модифицированных белков и убиквитин-зависимого пути деградации протеинов, тиолдисульфидной системы в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови при экспериментальном окислительном стрессе.

Задачи исследования:

1. Оценить роль окислительной модификации белков в механизмах нарушений регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови при окислительном стрессе *in vitro*.
2. Установить роль компонентов тиолдисульфидной системы в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови при экспериментальном окислительном стрессе.
3. Оценить участие убиквитина в механизмах нарушений регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови при экспериментальном окислительном стрессе.

4. Оценить влияние белков теплового шока 27 и 70 на окислительную модификацию белков и убиквитин-зависимую деградацию протеинов опухолевых клеток линии Jurkat.

5. Идентифицировать молекулярные мишени редокс-регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.

Научная новизна. Впервые получены новые знания фундаментального характера о молекулярных механизмах окислительной модификации белков, убиквитин-зависимом пути деградации протеинов, поддержании тиолдисульфидного баланса и их роли в редокс-зависимой дизрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии и экспериментальном окислительном стрессе. Индукцию апоптоза в лимфоцитах крови в условиях окислительного стресса *in vitro* вызывало накопление карбонильных производных белков, белково-связанного глутатиона на фоне возрастания концентрации Hsp27. Дизрегуляция программированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat была опосредована изменением редокс-статуса, гиперпродукцией Hsp27, Hsp70 и убиквитина. В ходе проведенного исследования доказано, что компоненты тиолдисульфидной системы (восстановленный и окисленный глутатион, глутатионредуктаза, тиоредоксинредуктаза) представляют собой потенциальные молекулярные мишени управления апоптозом опухолевых клеток линии Jurkat.

Новыми являются данные, отражающие участие белков теплового шока 27 и 70 в условиях внутриклеточного редокс-модулирования (ингибирование синтеза глутатиона *de novo*, восстановление и блокирование SH-групп пептидов и белков) в изменении уровня карбонильных производных белков и белково-связанного глутатиона, активации убиквитин-зависимого пути деградации белков, сопровождающиеся активацией апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat. Показано, что проапоптотический эффект редокс-модуляции и ингибирования Hsp27 опосредован участием восстановленного, окисленного и белково-связанного глутатиона в реализации рецепторного и митохондриального путей апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat. При этом установлено, что глутатионилирование и убиквитинилирование белков представляют собой редокс-зависимые молекулярные механизмы регуляции апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в результате проведенного фундаментального исследования фактические данные о роли компонентов тиолдисульфидной системы, окислительной модификации белков, их деградации в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток расширяют представления о патогенезе опухолевого роста. С целью моделирования окислительного стресса в лимфоцитах крови, сопровождающегося редокс-зависимой реализацией апоптоза, установлена оптимальная конечная концентрация пероксида водорода (0,5 мМ) для добавления в среду инкубации клеток. Выявлено, что изменение редокс-статуса опухолевых клеток линии Jurkat в сторону восстановленности сопровождалось активацией апоптоза преимущественно за счет вовлечения в процесс глутатионилирования SH-групп белков, а при смещении редокс-статуса в сторону окисления – путем накопления необратимых карбонильных производных протеинов с последующей активацией убиквитин-зависимого пути деградации.

Проведенное исследование открывает новые возможности управления клеточной гибелью на уровне белковых молекул, отвечающих за передачу внутриклеточного сигнала, активацию/инактивацию факторов транскрипции, активность и направленность метаболических путей при опухолевой прогрессии и других свободно-радикальных патологиях протекающих с участием лимфоцитов крови. Новые знания фундаментального характера о роли компонентов тиолдисульфидной системы, окислительной модификации белков и их деградации, Hsp27 и Hsp70 в регуляции апоптоза могут стать основой для разработки способов коррекции нарушений в реализации летальной программы клеток при различных патологических состояниях, сопровождающихся формированием окислительного стресса. Полученные данные об особенностях участия тиолдисульфидной системы в окислительной модификации белковых молекул и их деградации могут быть использованы для разработки новых технологий регуляции апоптоза опухолевых клеток.

Методология и методы исследования. В исследование были включены опухолевые клетки линии Jurkat («Т-лимфобластная лейкемия человека») (ФГБУН Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия) и лимфоциты крови, полученные у здоровых лиц.

Исследование было разделено на два этапа. Целью первого этапа явилось создание модели ОС в лимфоцитах крови путем экспериментального подбора оптимальной конечной концентрации пероксида водорода (0,5 мМ) для внесения в среду инкубации, в результате которой изучаемые клетки погибали с помощью апоптоза. Первый этап исследования заключался в оценке уровня сформированного ОС, реализации и регуляции апоптоза, особенностей реагирования компонентов тиолдисульфидной системы, ОМБ и их деградации в интактных опухолевых клетках и лимфоцитах крови, а также в условиях моделирования ОС *in vitro*.

На втором этапе исследования, для оценки участия ОМБ, их деградации, компонентов тиолдисульфидной системы, Hsp27 и Hsp70 в механизмах дисрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии, клетки линии Jurkat культивировали в присутствии индуктора апоптоза дексаметазона (DEX) и/или блокатора SH-групп пептидов и протеинов – N-этилмалеимида (NEM), протектора SH-групп пептидов и белков – 1,4-дитиоэритритола (DTE), ингибитора синтеза глутатиона *de novo* – бутионин-сульфоксимида (BSO) или ингибитора Hsp27 – 5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазола (KRIBB3).

Оценку реализации апоптоза, презентации на мембранах клеток CD5 (cluster of differentiation), TNF RI (tumor necrosis factor receptor I type), Fas-рецепторов, количества клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, содержания АФК проводили методом проточной лазерной цитофлюориметрии; концентрации белков NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1), Hsp27, Hsp70, убиквитина и убиквитинлигазы определяли с помощью вестерн-блотт анализа. Уровень экспрессии матричной РНК (мРНК) гена убиквитина оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени; активности каспазы-3, глутатионредуктазы (ГР), глутатионпероксидазы (ГПО), тиоредоксинредуктазы (ТРР), а также концентрацию общего белка, гидроксильного радикала, SH-групп белков (белок-SH), GSH, окисленного (GSSG) и

белково-связанного глутатиона (белок-SSG) – спектрофотометрическим методом; содержание карбонильных производных белков (КПБ) определяли с помощью иммуноферментного анализа; концентрацию битирозина и окисленного триптофана – спектрофлуориметрическим методом. Результаты проведенного исследования подвергали статистической обработке.

Положения, выносимые на защиту:

1. В интактных опухолевых клетках линии Jurkat дизрегуляция апоптоза опосредована дисбалансом тиолдисульфидной системы, сопровождающимся увеличением внутриклеточного содержания белков теплового шока 27 и 70, накоплением окислительно-модифицированных протеинов и активацией убиквитин-зависимого пути деградации белков. В лимфоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* (0,5 мМ H₂O₂) нарушение состояния тиолдисульфидной системы сопровождается увеличением содержания белка теплового шока 27, накоплением окислительно-модифицированных протеинов, что приводит к активации запрограммированной гибели клеток.

2. Изменение редокс-статуса тиолдисульфидной системы в условиях восстановления и блокирования SH-групп пептидов и белков, ингибирования синтеза глутатиона *de novo* и белка теплового шока 27 приводит к активации обратимой и необратимой окислительной модификации протеинов, что сопровождается индукцией рецепторного и митохондриального путей апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.

3. Активация убиквитин-зависимой деградации белков опосредована изменением редокс-статуса опухолевых клеток линии Jurkat на фоне накопления карбонильных производных протеинов. В редокс-зависимом регулировании уровня окислительно-модифицированных белков и активации убиквитин-зависимой деградации протеинов участвуют белки теплового шока 27 и 70.

4. Редокс-зависимая регуляция апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat осуществляется с помощью глутатионилирования и убиквитинилирования протеинов при участии белков теплового шока 27 и 70.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением работы на достаточном экспериментальном и клиническом материале с использованием современных и высокотехнологичных молекулярно-биологических методов исследований. Полученные результаты статистически обработаны с помощью современных методов доказательной медицины.

Результаты проведенного исследования докладывались и обсуждались на Международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине» (г. Сочи, 2012), Международной научной конференции «Фундаментальные исследования» (Израиль, г. Тель Авив, 2012), 10th International Congress «Cell Volume Regulation: Novel Therapeutic Targets & Pharmacological Approaches» (г. Москва, 2013), научно-практической конференции с международным участием, посвященной памяти профессора Е.Ф. Ларина «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных функций в норме и при патологии» (г. Томск, 2013), Proceedings of the 2nd European Conference on Biology and Medical Sciences (Austria, Vienna, 2014), Международной научно-практической конференции

«Современная наука: теоретический и практический взгляд» (г. Уфа, 2015), Международной научно-практической конференции «Достижения и проблемы современной науки» (г. Уфа, 2015), XLI заочной научной конференции «International Research Journal» (г. Екатеринбург, 2015), XXII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии-2016» (г. Санкт-Петербург, 2016).

Исследование поддержано грантами в рамках Федеральных целевых программ: «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2013 годы» (проект «Разработка технологических основ защиты клеток при гипоксии с использованием идентификации редокс-зависимых молекулярных мишеней управления ион-транспортирующими системами» (ГК № 16.512.11.2282)); «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» (проект «Разработка технологических основ действия мишень-направленных биологически активных молекул для коррекции нарушений пролиферации и программированной гибели опухолевых клеток» (ГК № 8302)), а также Советом по грантам при Президенте Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ Российской Федерации в рамках проектов «Идентификация молекулярных мишеней регуляции апоптоза, пролиферации и дифференцировки клеток крови при патологии инфекционного и неинфекционного генеза» (Грант Президента Российской Федерации № 16.120.11.614-НШ), «Молекулярные механизмы нарушения апоптоза, пролиферации, дифференцировки и коммуникации клеток крови при социально-значимых заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы» (Грант Президента Российской Федерации № 14.120.14.4184-НШ).

Получены патенты Российской Федерации на изобретения: «Способ оценки эффективности стимуляции антиоксидантной активности» № 2516925 от 04.04.2013 г. (Канская Н.В., Степовая Е.А., Федорова Н.А., Носарева О.Л., Позднякова И.А., Канский А.В., Твердохлебов С.И.), «Способ прогнозирования эффективности защиты лимфоцитов от перекисления» № 2525183 от 07.05.2013 г. (Канская Н.В., Степовая Е.А., Федорова Н.А., Носарева О.Л., Позднякова И.А., Канский А.В., Твердохлебов С.И.), «Способ защиты клеток от апоптоза» № 2541774 от 07.05.2013 г. (Канская Н.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л., Позднякова И.А., Федорова Н.А., Твердохлебов С.И., Канский А.В.).

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедр патофизиологии (раздел «Патофизиология, клиническая патофизиология»), биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики (раздел «Молекулярная биология»); в научно-исследовательском процессе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (с 01.07.2016 г. ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 38 работ, из них 17 статей – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации, 6 – цитируемых в Web of Science, 6 – цитируемых в Scopus, а также 3 патента Российской Федерации на изобретения.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 235 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 513 источников – 66 отечественных и 447 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 20 таблицами.

Личный вклад автора. Автором проведено планирование и разработка дизайна исследования, сформулированы цель и задачи исследования, выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, отражающей современное состояние исследований по данной научной проблеме, определен методологический подход, позволяющий наиболее полно решить поставленные в исследовании задачи, самостоятельно выполнен весь комплекс запланированных методов, проведена статистическая обработка данных, интерпретация результатов исследования и подготовка их к публикации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с поставленными целью и задачами исследования материалом служили опухолевые клетки линии Jurkat («Т-лимфобластная лейкемия человека») и лимфоциты крови. Опухолевые клетки линии Jurkat были получены из Российской коллекции клеточных культур ФГБУН Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, Россия).

Лимфоциты крови получали у здоровых лиц (42 мужчины и 38 женщин в возрасте от 20 до 45 лет (средний возраст – 31 ± 9 лет)) из венозной крови, взятой из локтевой вены утром до приема пищи с помощью стандартных вакуумных систем «Vecton Dickinson Vacutainer™» (США) с антикоагулянтами: гепарином натрия (25 Ед/мл) или этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) (1,7 мг/мл). Критериями исключения из группы обследованных являлись возраст моложе 20-ти и старше 45-ти лет; наличие в анамнезе острых и хронических инфекционных, воспалительных заболеваний, вирусных инфекций (гепатит, клещевой энцефалит и др.), метаболического синдрома, сахарного диабета, аутоиммунных заболеваний, злокачественных новообразований, психических расстройств, алкогольной и наркотической зависимостей, отсутствие информированного согласия о добровольном участии в исследовании или несогласие здоровых лиц с требованиями протокола исследования (протокол заседания этического комитета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России № 2110 от 31.10.2011 г. и № 4267 от 21.09.2015 г.).

Исследование проводилось на базе кафедры патофизиологии и кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

На первом этапе исследований интактные опухолевые клетки линии Jurkat и выделенные на двойном градиенте Перколла (Ulmer A.J., Flad H.D., 1979) лимфоциты крови (суспензия клеток, стандартизованная до 4×10^6 клеток/мл) культивировали в стерильных условиях в полной культуральной среде RPMI-1640 (90 % RPMI-1640 («Вектор-Бест», Россия), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Invitrogen», США), инактивированной в течение 30 мин при температуре $+56^\circ\text{C}$, 2 мМ Нерес («Flow», Великобритания), гентамицин (100 мкг/мл) («KRKA», Словения) и L-глутамин (0,3 мг/мл) («Вектор-Бест», Россия)) при добавлении в среду инкубации различных конечных концентраций пероксида водорода (0,3; 0,5; 1,0; 2,0 мМ).

Инкубацию клеток проводили в течение 18 ч в полуоткрытой системе при температуре +37°C в атмосфере 5 % CO₂ с использованием CO₂-инкубатора «МСО-5АІС» («Sanyo», Япония) в стерильных культуральных 24-х луночных планшетах в объеме полной культуральной среды RPMI-1640 1,0 мл на лунку. Определяли количество аннексин-, пропидий йодид-положительных клеток, концентрацию АФК, GSH, GSSG, рассчитывали соотношение GSH/GSSG.

Для оценки участия ОМБ и их деградации, компонентов тиолдисульфидной системы в механизмах дизрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии и ОС *in vitro*, клетки линии Jurkat, интактные лимфоциты крови и лимфоциты крови в присутствии 0,5 мМ Н₂О₂ инкубировали в полной культуральной среде RPMI-1640 в течение 18 ч в полуоткрытой системе при температуре +37°C в атмосфере 5 % CO₂ с использованием CO₂-инкубатора «МСО-5АІС» («Sanyo», Япония) в стерильных культуральных 24-х луночных планшетах («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) в объеме полной культуральной среды RPMI-1640 1,0 мл на лунку (таблица 1).

На втором этапе работы, для выяснения особенностей молекулярных механизмов ОМБ, их деградации, вклада компонентов тиолдисульфидной системы, Hsp27 и Hsp70 в механизмы дизрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии, клетки линии Jurkat культивировали в присутствии DEX («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 10 мкМ (Кайгородова Е.В. и др., 2010) и/или NEM («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 5 мМ (Sahaf B. et al., 2003), BSO («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 1 мМ, (Laragione T. et al., 2003), DTE («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 5 мМ (Brunelli L. et al., 1995), KRIBB3 («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 0,1 мкМ (Кайгородова Е.В. и др., 2012) в течение 18 ч в полуоткрытой системе при температуре +37°C в атмосфере 5 % CO₂ с использованием CO₂-инкубатора «МСО-5АІС» («Sanyo», Япония) в стерильных культуральных 24-х луночных планшетах в объеме полной культуральной среды RPMI-1640 1,0 мл на лунку (таблица 2).

В опыте использовались культуры клеток, содержащие не более 5 % погибших клеток. Жизнеспособность клеток оценивали микроскопическим методом с помощью 0,4 % раствора трипанового синего («Serva», США).

Количественную оценку клеток, вступивших в апоптоз, проводили с использованием FITC-меченного аннексина V и пропидия йодида («TREVIGEN», США); несущих на своей поверхности Fas-рецептор – с использованием моноклональных антител к человеческому антигену CD95, конъюгированных с FITC («R&D Systems», США), TNF RI – с использованием моноклональных антител к человеческому антигену CD120, меченных фикоэритрином («R&D Systems», США); со сниженным митохондриальным потенциалом – с использованием флюорохрома 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолилкарбоцианин йодида (JC-1) (Castedo M. et al., 1996; Perry S.W. et al., 2011); внутриклеточного содержания АФК – с помощью красителя с заблокированной флюоресценцией – 2,7-дихлорфлюоресцеина диацетата («Sigma-Aldrich», США) (Halliwell B., Whiteman M., 2004) на проточном цитофлюориметре FACS Canto™ II («Becton Dickinson», США) с применением программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3.

Таблица 1 – Определяемые параметры в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, интактных лимфоцитах крови и в условиях окислительного стресса *in vitro*

Показатели	Интакт-ные лим-фоциты крови	Лимфоциты крови +0,5 мМ H ₂ O ₂	Интактные опухолевые клетки линии Jurkat
Количество аннексин-положительных клеток	6	6	6
Количество Fas-положительных клеток	6	–	6
Количество TNF RI-положительных клеток	6	–	6
Активность каспазы-3	6	6	6
Количество клеток со сниженным митохондриальным потенциалом	6	6	6
Содержание Araf-1	6	–	6
Содержание NF-κB	6	6	6
Содержание Hsp27	6	6	6
Содержание Hsp70	6	–	6
Концентрация активных форм кислорода	6	6	6
Содержание гидроксильного радикала	10	10	10
Концентрация GSH	6	6	10
Концентрация GSSG	6	6	10
Величина соотношения GSH/GSSG	6	6	10
Активность глутатионредуктазы	10	10	10
Активность глутатионпероксидазы	10	10	10
Активность тиоредоксинредуктазы	10	10	10
Содержание белок-SH	6	6	6
Содержание белок-SSG	6	6	6
Содержание КПБ	6	6	6
Содержание окисленного триптофана	6	–	6
Содержание битиروزина	6	–	6
Уровень экспрессии мРНК гена убиквитина	6	–	6
Содержание убиквитина	6	–	6
Содержание убиквитинлигазы	–	–	6

Для определения содержания транскрипционных факторов NF-κB, Araf-1; Hsp27, Hsp70, убиквитина и убиквитинлигазы был применен метод вестерн-блоттинга с использованием первичных моноклональных антител к NF-κB (активной субъединице p65 – RelA) («Sigma-Aldrich», США) в разведении 1:1000, Araf-1 («R&D Systems», США) – 0,25-0,5 мкг/мл, убиквитину («Sigma-Aldrich», США) – 1:1000, убиквитинлигазе («Sigma-Aldrich», США) – 1,0 мкг/мл, фосфорилированным формам Hsp27 («Sigma-Aldrich», США) – 1:2000 и Hsp70 («Sigma-Aldrich», США) – 1:1000. Вывод о содержании исследуемого белка в клетке делали по изменению отношения величины сигнала метки искомого белка к величине сигнала белка цитоскелета β-актина («Sigma-Aldrich», США), используя программное обеспечение ImageJ2x Version 2.1.4.7 («Wayne Rasband National Institutes of Health», США).

Таблица 2 – Определяемые параметры в опухолевых клетках линии Jurkat при различных условиях культивирования

Показатели	Условия культивирования								
	DEX	NEM	BSO	DTE	KRIBB3	NEM+DEX	BSO+DEX	DTE+DEX	KRIBB3+DEX
Количество аннексин-положительных клеток	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Количество Fas-положительных клеток	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Количество TNF RI-положительных клеток	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Активность каспазы-3	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Количество клеток со сниженным митохондриальным потенциалом	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание Araf-1	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание NF-κB	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание Hsp27	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание Hsp70	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Концентрация активных форм кислорода	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание гидроксильного радикала	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Концентрация GSH	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Концентрация GSSG	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Величина соотношения GSH/GSSG	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Активность глутатионредуктазы	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Активность глутатионпероксидазы	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Активность тиоредоксинредуктазы	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Содержание белок-SH	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание белок-SSG	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание КПБ	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание окисленного триптофана	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание битирозина	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание убиквитина	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание убиквитинлигазы	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Активность каспазы-3 определяли спектрофлуориметрически с помощью метода основанном на избирательном гидролизе ферментом синтетического тетрапептидного флюоригенного субстрата N-ацетил-(Асп-Глу-Вал-Асп)-7-амино-4-метилкумарина («Sigma-Aldrich», США) с образованием продукта – аминокумарина, который флюоресцировал в диапазоне длин волн 430-460 нм (максимум возбуждения флюоресценции при длине волны 360 нм) (Cohen G.M., 1997; Nicholson D.W., 1999).

Внутриклеточную продукцию гидроксильного радикала оценивали спектрофотометрически по его способности разрушать субстрат – 2-дезоксидрибозу («Sigma-Aldrich», США), после опсонизации клеток раствором зимозана («Sigma-Aldrich», США) (Thom S.R., Elbuken M.E., 1991).

Содержание GSH и GSSG определяли спектрофотометрическим методом ферментативной рециркуляции и блокирования SH-групп GSH винилпиридином («Wako», Япония), предложенным M.E. Anderson (1985) в модификации S. Kojima и соавторов (2004) (Kojima S. et al., 2004). Дополнительно рассчитывали величину соотношения GSH/GSSG как показатель редокс-статуса клетки. Концентрацию SH-групп белков определяли спектрофотометрическим методом по способности тиоловых соединений взаимодействовать с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой (ДТНБ) («Sigma-Aldrich», США) и образовывать окрашенное соединение тио-2-нитробензойную кислоту, водный раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм, а уровень белково-связанного глутатиона – после предварительного его высвобождения 1 % NaBH₄ («Sigma-Aldrich», США) из связи с белками (Burchill B.R. et al., 1978). Активность ГР определяли, основываясь на ее способности восстанавливать GSSG до 2 GSH в присутствии восстановленного никотинамидадениндинуклеотид фосфата (НАДФН) («Sigma-Aldrich», США) и дальнейшем взаимодействии GSH и ДТНБ с образованием тио-2-нитробензойной кислоты, водный раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм (Worthington D.J., Rosemeyer M.A., 1976). Активность ТРР оценивали по способности катализировать НАДФН-зависимое восстановление субстратов, реагирующих с ДТНБ, образуя при этом тио-2-нитробензойной кислоту, раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм (Tamura T., Stadtman T.C., 1996). Активность ГПО определяли с помощью метода, основанном на способности фермента катализировать реакцию взаимодействия GSH с гидропероксидом трет-бутила (Карпищенко А.И., 1998).

Для определения содержания карбонильных производных белков (КПБ) использовали набор «Carbonyl Proteine ELISA Kit» («Immundiagnostik AG», Германия). Метод основан на реакции КПБ с 2,4-динитрофенилгидразином.

Содержание битирозина и окисленного триптофана проводили спектрофлуориметрическим методом K.J. Davies (1987) (Davies K.J., 1987) в модификации Э.М. Бекмана и соавт. (2006) (Бекман Э.М. и др., 2006). Окисление триптофановых остатков учитывали по снижению флуоресценции при длине волны возбуждения 295 нм и длине волны испускания 325 нм, а флуоресценцию образованного битирозина – при длине волны возбуждения 325 нм и длине волны испускания 415 нм.

Для количественного определения уровня мРНК гена убиквитина использовали метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием специфических праймеров к гену убиквитина (for: 5'-CCG-TGG-GTA-GTG-GTT-GAT-CT-3'; rev: 5'-AGC-GAT-TCC-GCA-TCG-TCA-G-3'; 116 пар нуклеотидов) (Seghatoleslam A. et al., 2012), нормировочного гена β-актина (for: 5'-CCT-GTA-CGC-CAA-CAC-AGT-GC-3'; rev: 5'-ATA-CTC-CTG-CTT-GCT-GAT-CC-3'; 140 пар нуклеотидов) (Ho-Pun-Cheung A. et al., 2009) и набора реагентов «qPCRmix-HS SYBR» («Евроген», Россия) на амплификаторе «RotorGene Q»

(«QIAGEN», Германия). Принцип метода заключался в анализе кинетики накопления продуктов амплификации исследуемого гена с помощью интеркалирующего флюоресцентного красителя SYBR Green I. Выделение тотальной РНК из клеток осуществляли сорбентно-колоночным методом с помощью набора реагентов «АхуPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit» («Ахуgen Biosciences», США) согласно протоколу производителя. Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) на матрице мРНК путем обратной транскрипции использовали набор реагентов «MMLV RT kit» («Евроген», Россия). Количественное выражение результатов проводили с помощью расчета разницы экспрессии гена убиквитина относительно экспрессии гена β -актина по формуле $2\Delta Ct$ ($dCt=2^{(Ct \text{ нормировочного гена} - Ct \text{ искомого гена})}$) (Schmittgen T.D., Livak K.J., 2008).

Концентрацию общего белка определяли спектрофотометрически по взаимодействию красителя Кумасси голубого G-250 с остатками аргинина и лизина белковых молекул и образованию комплекса, который имел максимум поглощения при длине волны 595 нм (Bradford M.M., 1976).

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез (Гланц С., 1999). Обработку данных проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.0» for Windows. Нормальность распределения признаков проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилки. Описательный анализ выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения, включал расчет медианы (Me), первого (Q_1) и третьего (Q_3) квартилей.

Сравнительный анализ уровня статистической значимости различий трех и более выборок проводили с помощью непараметрического аналога дисперсионного анализа – H-критерия Крускала-Уоллиса. Уровень статистической значимости различий между попарно-несвязанными выборками оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Уровень статистической значимости взаимосвязи между различными параметрами внутри исследуемых выборок оценивали с помощью критерия ранговой корреляции Спирмена, вычисляя коэффициент корреляции (r_s). При проверке статистических гипотез и оценке коэффициентов корреляции критический уровень значимости (p) был равен 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Участие активных форм кислорода в регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови в условиях окислительного стресса *in vitro*

В настоящее время идентификация молекулярных механизмов и мишеней регуляции апоптоза является важным направлением фундаментальных исследований. Запуск и реализация апоптоза зависят от наличия и активности модулирующих внутриклеточных факторов и процессов (Манских В.Н., 2007; Fil'chenkov A.A., 2013; Karch J., Molkentin J.D., 2015). Нарушение баланса между пролиферацией, дифференцировкой и апоптозом приводит к развитию патологических процессов в различных органах и тканях (Boland M.L. et al., 2013; Sinha K. et al., 2013; Green D.R. et

al., 2014). Опухолевая прогрессия сопровождается изменением метаболизма и функций клеток, образования и утилизации активных кислородных метаболитов; характеризуется формированием ОС, с одной стороны, и ингибированием апоптоза, – с другой стороны.

В представленном исследовании была использована модель ОС *in vitro* в лимфоцитах крови. Одним из способов индукции апоптоза является воздействие пероксида водорода на изучаемые клетки (Cumming R.C. et al., 2004; Архипов С.А. и др., 2010). Малочисленные данные литературы об особенностях реагирования системы глутатиона в лимфоцитах крови в зависимости от концентрации пероксида водорода *in vitro*, разнообразие способов индикации фенотипических проявлений апоптоза и некроза определили необходимость экспериментального подбора оптимальной концентрации пероксида водорода, способной эффективно индуцировать развитие ОС и запуск запрограммированной гибели максимального числа лимфоцитов крови, но не их элиминацию по пути некроза. С целью индукции ОС мы использовали концентрации пероксида водорода: 0,3; 0,5; 1,0 и 2,0 мМ для внесения в среду инкубации лимфоцитов крови.

Добавление в среду инкубирования лимфоцитов крови пероксида водорода в конечной концентрации равной 0,5 мМ сопровождалось максимальным процентом аннексин-положительных и минимальным процентом пропидий йодид-положительных клеток (рисунок 1) на фоне увеличения концентраций АФК, GSH, GSSG и величины соотношения GSH/GSSG сопоставимых с их содержанием в интактных опухолевых клетках линии Jurkat (таблица 3).

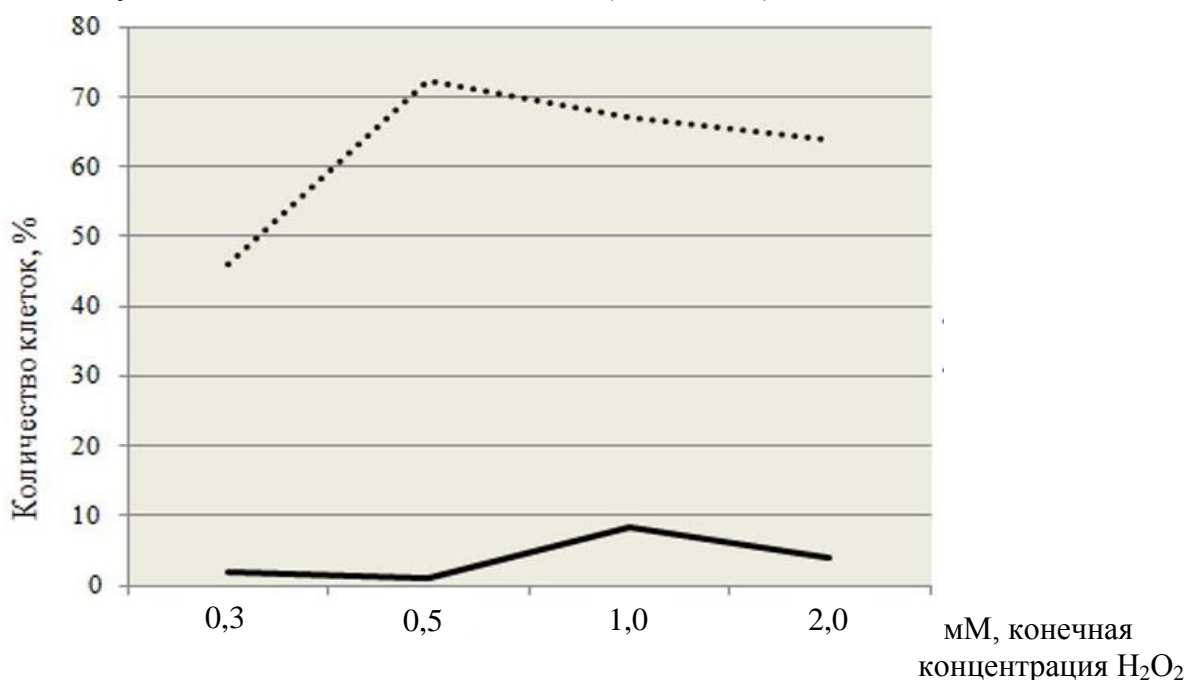


Рисунок 1 – Влияние различных концентраций пероксида водорода на содержание аннексин-положительных и пропидий йодид-положительных лимфоцитов крови

Примечание – _____ – пропидий йодид-положительные клетки,
 – аннексин-положительные клетки

Таблица 3 – Концентрация активных форм кислорода, восстановленного и окисленного глутатиона, величина соотношения восстановленной и окисленной формы пептида в интактных клетках опухолевой линии Jurkat, интактных лимфоцитов крови и при различных концентрациях пероксида водорода в среде инкубации, (Me (Q₁-Q₃))

Показатели	Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	Интактные лимфоциты крови	Конечная концентрация H ₂ O ₂ в инкубационной среде лимфоцитов крови			
			0,3 мМ	0,5 мМ	1,0 мМ	2,0 мМ
Активные формы кислорода, у.е.	0,650 (0,491-1,980)	0,105 (0,099-0,122) p ₁ <0,05	0,452 (0,344-0,650) p ₂ <0,05	0,714 (0,570-1,922) p ₂ <0,05	0,812 (0,780-1,233) p ₂ <0,05	1,561 (1,431-1,893) p ₂ <0,05
GSH, нмоль/мг белка	2,051 (1,927-2,314)	0,747 (0,741-0,880) p ₁ <0,05	1,908 (1,895-1,922) p ₂ <0,05	2,084 (1,523-2,160) p ₂ <0,05	2,218 (1,910-3,190) p ₂ <0,05	1,832 (1,780-1,854) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
GSSG, нмоль/мг белка	0,164 (0,150-0,190)	0,110 (0,099-0,114) p ₁ <0,05	0,140 (0,139-0,143) p ₁ <0,05	0,168 (0,152-0,169) p ₂ <0,05	0,136 (0,111-0,140)	0,249 (0,167-0,306) p ₂ <0,05
GSH/GSSG	13,140 (11,361-14,230)	7,165 (6,517-8,000) p ₁ <0,05	13,590 (13,439-13,813) p ₂ <0,05	12,410 (10,714-12,781) p ₂ <0,05	17,480 (14,964-22,949) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	7,038 (5,360-10,963) p ₁ <0,05

Примечание – p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с интактными опухолевыми клетками линии Jurkat, p₂ – уровень статистической значимости различий по сравнению с интактными лимфоцитами крови

Известно, что в поддержании редокс-баланса клеток принимают участие компоненты тиолдисульфидной системы, а при ОС неизбежно активируются процессы окислительной модификации макромолекул и запуска апоптоза. В связи с этим, нам представилось целесообразным выяснить особенности участия компонентов тиолдисульфидной системы, ОМБ и их деградации в молекулярных механизмах формирования феномена «ускользания» от апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat, а также в молекулярных механизмах рецептор-опосредованного и митохондриального пути апоптоза в лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro*. Для нормального функционирования и адекватного реагирования на изменения внешней и внутренней среды, поддержания гомеостаза всего организма клеткам необходимы плазматические рецепторы. Конформационные изменения структуры мембранных рецепторов определяют их сродство как к лигандам природного происхождения, так

и к молекулам, полученным химическим синтезом (Lindoso R.S. et al., 2016; Zong W.X. et al., 2016).

На возможную взаимосвязь между изменением в содержании АФК, фракций глутатиона и экспрессией плазматических рецепторов указывает особенность строения Fas-рецептора, а именно наличие трех внеклеточных доменов, обогащенных цистеином. Богатые цистеином и, соответственно, атомами серы последовательности в эволюционно-консервативных доменах плазматических рецепторов, обеспечивающих межклеточные, матрикс-клеточные и гуморально-клеточные взаимодействия (адрено-, холино- и дофаминовые рецепторы, интегрины, кадгеринины, рецепторы ростовых факторов, интерферонов, интерлейкинов и др.) представляют собой потенциальные молекулярные мишени для селективного управления апоптозом (Plenchette S. et al., 2015). Восстановленное состояние атома серы или ее участие в образовании дисульфидной связи в молекуле белков-рецепторов определяет функционально неактивную или функционально активную конформацию последних. С другой стороны, презентация плазматических рецепторов напрямую зависит от состояния фосфолипидов мембраны и интенсивности перекисного окисления липидов (Gajate C., Mollinedo F., 2015; Mollinedo F., Gajate C., 2015).

В результате проведенного исследования нами было получено достоверно значимое снижение презентации Fas-рецепторов в 2,43 раза ($p < 0,05$) на плазматической мембране опухолевых клеток линии Jurkat по сравнению с интактными лимфоцитами крови.

Следует отметить, что в интактных опухолевых клетках линии Jurkat (0,650 (0,491-1,980) у.е.) и в лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro* (0,714 (0,570-1,922) у.е.) содержание АФК, которое отражает уровень внутриклеточного пероксида водорода, было сопоставимым.

При моделировании ОС *in vitro* в лимфоцитах крови концентрация гидроксильного радикала составила 130,67 (118,09-149,73) нмоль/мг белка, что было достоверно выше в 2,83 раза ($p < 0,05$) по сравнению с показателями в интактных лимфоцитах крови (46,17 (36,31-55,04) нмоль/мг белка). Содержание гидроксильного радикала в интактных опухолевых клетках линии Jurkat (523,00 (415,10-719,37) нмоль/мг белка) было выше достоверно в 4,00 раза ($p < 0,05$) по сравнению с показателем в лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro*.

Механизм повышенной продукции гидроксильного радикала в опухолевых клетках, вероятнее всего, связан со снижением значения рН и активной мобилизацией железа из белков (Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В., 2008; Pisoschi A.M., Pop A., 2015). Гидроксильный радикал является наиболее токсичным из АФК, проявляя прямое действие на клеточные биополимеры, в основном на белковые молекулы (Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В., 2008; Chen Y., Gibson S.B., 2008; Зенков Н.К. и др., 2009).

В ходе проведенного исследования нами было установлено достоверно значимое увеличение количества интактных опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови, инкубированных в условиях ОС *in vitro*, со сниженным митохондриальным потенциалом ($\Delta\psi$) на фоне гиперпродукции АФК по сравнению с интактными лимфоцитами крови (таблица 4). При этом лимфоциты крови, инкубированные в присутствии 0,5 мМ H_2O_2 , более активно вступали в процесс

апоптоза по сравнению с интактными опухолевыми клетками линии Jurkat на фоне сопоставимых значений содержания антиапоптотического фактора транскрипции – NF-κB в этих клетках (таблица 4).

Таблица 4 – Параметры, характеризующие реализацию и регуляцию апоптоза в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, интактных лимфоцитах крови и в условиях окислительного стресса *in vitro*, (Me (Q₁-Q₃))

Группы		Количество аннексин-положительных клеток, %	Количество клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, %	Активность каспазы-3, пмоль/мин×мг белка	Содержание NF-κB, у.е.	Содержание Araf-1, у.е.
Интактные лимфоциты крови	1	23,12 (21,90-24,50)	8,90 (8,00-10,00)	108,44 (103,48-112,66)	1,470 (1,445-1,500)	0,308 (0,302-0,318)
Лимфоциты крови +0,5 мМ H ₂ O ₂	2	67,90 (53,10-69,30) p ₂₋₁ <0,05	18,70 (17,80-20,80) p ₂₋₁ <0,05	224,16 (220,34-227,18) p ₂₋₁ <0,05	3,015 (3,010-3,022) p ₂₋₁ <0,05	–
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	3	5,20 (4,00-5,60) p ₃₋₁ <0,05 p ₃₋₂ <0,05	18,00 (15,10-19,00) p ₃₋₁ <0,05	36,58 (22,66-43,89) p ₃₋₁ <0,05 p ₃₋₂ <0,05	3,106 (3,095-3,128) p ₃₋₁ <0,05	1,884 (1,856-1,917) p ₃₋₁ <0,05

Примечание – Здесь и далее в таблицах 5, 6, 7, 8: p_{n-m} – уровень статистической значимости различий между соответствующими группами сравнения

Снижение Δψ сопровождается, по-видимому, формированием в опухолевых клетках линии Jurkat гипознергетического состояния. Поэтому можно предположить, что недостаток АТФ мог ингибировать фосфорилирование белков и, тем самым, способствовать их вовлечению в другие типы ковалентной модификации, такие как глутатионилирование и убиквитинилирование.

Неферментативной ловушкой свободных радикалов в клетке выступает GSH, который поставляет восстановленные тиоловые группы в реакциях антиоксидантной защиты (Harwood D.T. et al., 2006; Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 2010; Chatterjee A., 2013). Одновременно глутатион является кофактором для глутатионзависимых ферментов, которым принадлежит ведущая роль не только в реализации антиоксидантных процессов, но и в поддержании структуры и функций биологических мембран, обеспечении адекватного срабатывания рецепторного аппарата клетки (Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 2010). В условиях развития ОС происходит неизбежное образование GSSG, который по сравнению с GSH, обладает большей реакционной способностью по отношению к белковым молекулам и играет

главную роль в образовании смешанных дисульфидов с белками (глутатионилировании).

Нами было установлено достоверно значимое увеличение содержания как GSH, так и GSSG, величины соотношения GSH/GSSG в лимфоцитах крови при ОС *in vitro* и в интактных опухолевых клетках линии Jurkat по сравнению с интактными лимфоцитами крови (таблица 5).

Таблица 5 – Показатели тиолдисульфидной системы в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, интактных лимфоцитах крови и в условиях окислительного стресса *in vitro*, (Me (Q₁-Q₃))

Группы		Содержание GSH, нмоль/мг белка	Содержание GSSG, нмоль/мг белка	Величина соотношения GSH/GSSG	Активность ГР, нмоль/мин×мг белка	Активность ТРР, нмоль/мин×мг белка	Активность ГПО, мкмоль/мин×мг белка
Интактные лимфоциты крови	1	0,747 (0,741-0,880)	0,110 (0,099-0,114)	7,165 (6,517-8,000)	312,80 (287,08-321,70)	4,44 (3,02-5,12)	5,68 (5,06-7,00)
Лимфоциты крови +0,5 мМ Н ₂ О ₂	2	2,084 (1,523-2,160) p ₂₋₁ <0,05	0,168 (0,152-0,169) p ₂₋₁ <0,05	12,410 (10,714-12,781) p ₂₋₁ <0,05	277,56 (213,36-353,95)	7,79 (6,24-9,38) p ₂₋₁ <0,05	9,28 (7,95-10,22) p ₂₋₁ <0,05
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	3	2,051 (1,927-2,314) p ₃₋₁ <0,05	0,164 (0,150-0,190) p ₃₋₁ <0,05	13,140 (11,361-14,230) p ₃₋₁ <0,05	119,45 (96,30-162,74) p ₃₋₁ <0,05 p ₃₋₂ <0,05	20,31 (16,25-24,37) p ₃₋₁ <0,05 p ₃₋₂ <0,05	10,54 (8,18-12,20) p ₃₋₁ <0,05

При этом внесение пероксида водорода в конечной концентрации 0,5 мМ в среду инкубирования лимфоцитов крови сопровождалось увеличением активности ГПО благодаря реализации внутриклеточного резерва восстановленного трипептида в качестве одного из субстратов глутатионпероксидазной реакции (таблица 5). Соответственно, увеличение содержания окисленной фракции тиола в этих клетках может быть связано, как и с возрастанием активности ГПО, так и с зафиксированным нами сопоставимым значением активности ГР по сравнению с интактными лимфоцитами крови (таблица 5).

В интактных опухолевых клетках линии Jurkat возросший пул GSH приводил к достоверно значимому увеличению активности ГПО, а повышенная концентрация GSSG обеспечивалась достоверно значимым снижением активности ГР по сравнению с показателями как в интактных лимфоцитах крови, так и со значениями в лимфоцитах крови при ОС *in vitro* (таблица 5).

В ходе проведенного исследования нами было установлено достоверно значимое повышение активности ТРР на фоне развития ОС в опухолевых клетках линии Jurkat, по сравнению со значениями в интактных лимфоцитах крови и лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro* (таблица 5). Это обеспечивало поддержание

уровня восстановленного тиоредоксина необходимого для утилизации АФК. Зафиксированное нами значимое повышение активности ТРР в лимфоцитах крови при ОС *in vitro*, вероятнее всего, происходит за счет усиленного восстановления тиоредоксина, который использовался в качестве донора SH-групп для утилизации повышенного содержания АФК.

В опухолевой клетке в условиях ОС активно происходит окислительная модификация макромолекул, в том числе белков (Chaudhari N. et al., 2014). Согласно современным представлениям, окислительной модификации могут подвергаться все остатки аминокислот в белках, но наиболее чувствительными являются остатки триптофана, тирозина, гистидина и цистеина (Дубинина Е.Е., 2006; Molnár G.A. et al., 2015). В настоящее время установлено, что ОМБ приводит к появлению метаболитов, которые могут служить причиной вторичного повреждения других биомолекул (Дубинина Е.Е., 2006; Stadtman E.R., 2006; Guo Z. et al., 2016). Белковая молекула, поврежденная гидроксильным радикалом, содержит большое количество пероксидов и может легко вступать во взаимодействие с восстановленной формой глутатиона (Simpson J.A. et al., 1992). Окислительно-модифицированные протеины, в том числе компоненты цепи переносчиков электронов, АТФ-синтаза изменяют ферментативную активность, вызывая потерю электронов из электрон-транспортной системы, разобщение окислительного фосфорилирования и гипоенергетическое состояние (Grimsrud P.A. et al., 2008). Несмотря на это, опухолевые клетки активно «ускользают» от запрограммированной гибели и успешно выживают. В этой связи нам представилось целесообразным изучить некоторые особенности ОМБ и сопоставить полученные данные с показателями реализации и регуляции апоптоза в интактных лимфоцитах крови, лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro* и в опухолевых клетках линии Jurkat. В результате проведенного исследования нами было установлено достоверно значимое увеличение содержания белково-связанного глутатиона и КПБ на фоне снижения концентрации SH-групп белков в лимфоцитах крови при ОС *in vitro* и в интактных опухолевых клетках линии Jurkat по сравнению с показателями в интактных лимфоцитах крови (таблица 6).

Следует отметить, что в интактных опухолевых клетках линии Jurkat концентрация белково-связанного глутатиона и SH-групп белков была достоверно выше, чем в лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro* (таблица 6). Кроме этого, в интактных опухолевых клетках линии Jurkat нами было получено достоверно значимое увеличение содержания окисленного триптофана и битирозина, по сравнению с результатами, полученными при оценке интактных лимфоцитов крови (таблица 6).

Окислительная модификация протеинов способна приводить к агрегации и деградации молекул данных белков. Необратимое повреждение белковых молекул в интактных опухолевых клетках линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым увеличением уровня экспрессии мРНК гена и концентрации убиквитина, относительно результатов в интактных лимфоцитах крови, что косвенно указывало на его активное использование в убиквитинлигазной реакции (таблица 7).

Таблица 6 – Параметры окислительной модификации белков в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, интактных лимфоцитах крови и в условиях окислительного стресса *in vitro*, (Me (Q₁-Q₃))

Группы		Содержание белок-SH, нмоль/мг белка	Содержание белок-SSG, нмоль/мг белка	Содержание КПБ, нмоль/мг белка	Содержание окисленного триптофана, у.е./мг белка	Содержание битирозина, у.е./мг белка
Интактные лимфоциты крови	1	2,84 (1,79-2,94)	0,05 (0,04-0,06)	0,149 (0,142-0,151)	2,31 (2,16-2,34)	0,13 (0,12-0,20)
Лимфоциты крови +0,5 мМ H ₂ O ₂	2	0,33 (0,28-0,38) p ₂₋₁ <0,05	0,14 (0,13-0,15) p ₂₋₁ <0,05	0,359 (0,354-0,362) p ₂₋₁ <0,05	–	–
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	3	1,26 (1,08-1,34) p ₃₋₁ <0,05 p ₃₋₂ <0,05	0,42 (0,40-0,57) p ₃₋₁ <0,05 p ₃₋₂ <0,05	0,382 (0,379-0,388) p ₃₋₁ <0,05	25,19 (22,14-38,30) p ₃₋₁ <0,05	0,76 (0,51-1,52) p ₃₋₁ <0,05

Таблица 7 – Содержание убиквитина и убиквитинлигазы в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови, (Me (Q₁-Q₃))

Группы		Уровень экспрессии мРНК гена убиквитина, у.е.	Содержание убиквитина, у.е.	Содержание убиквитинлигазы, у.е.
Интактные лимфоциты крови	1	0,0009 (0,0005-0,0119)	0,138 (0,117-0,144)	–
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	2	0,0165 (0,0045-0,0177) p ₂₋₁ <0,05	3,177 (3,099-3,412) p ₂₋₁ <0,05	1,672 (1,588-1,711)

Проведенный нами корреляционный анализ полученных результатов в интактных опухолевых клетках линии Jurkat позволил установить отрицательные взаимосвязи между количеством аннексин-положительных клеток и содержанием убиквитинлигазы ($r = -0,81$; $p < 0,05$), числом TNF RI-положительных клеток и концентрацией убиквитинлигазы ($r = -0,83$; $p < 0,05$), числом Fas-позитивных клеток и содержанием убиквитина ($r = -0,86$; $p < 0,05$). Таким образом, установленная нами высокая концентрация убиквитина и убиквитинлигазы способствовали, по-видимому, сниженной презентации апоптоз-индуцирующих рецепторов и аннексина V на плазматической мембране, тем самым, опосредуя формирование феномена «ускользания» от апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.

Полученные нами данные, вероятно, указывают на формирование ОС и несостоятельность Hsp27 и Hsp70 в обеспечении адекватной скорости рефолдинга протеинов в интактных опухолевых клетках линии Jurkat (таблица 8).

Таблица 8 – Содержание белков теплового шока 27 и 70 в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, интактных лимфоцитах крови и в условиях окислительного стресса *in vitro*, (Me (Q₁-Q₃))

Группы		Содержание Hsp27, у.е.	Содержание Hsp70, у.е.
Интактные лимфоциты крови	1	1,502 (1,453-1,520)	1,579 (1,566-1,600)
Лимфоциты крови +0,5 мМ Н ₂ О ₂	2	1,962 (1,922-2,012) p ₂₋₁ <0,05	–
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	3	2,890 (2,340-2,993) p ₃₋₁ <0,05; p ₃₋₂ <0,05	4,614 (4,416-4,710) p ₃₋₁ <0,05

Кроме того, опираясь на полученные результаты, можно сделать предположение об участии глутатионилирования белков в ингибировании апоптоза интактных опухолевых клеток линии Jurkat, так как накопление КПБ в опухолевых клетках сопровождалось увеличением концентрации белково-связанного глутатиона на фоне снижения числа аннексин-положительных клеток и активности каспазы-3 относительно показателей в интактных лимфоцитах крови (таблицы 4, 6).

Каспазу-3 относят к редокс-регулируемым ферментам апоптоза (Nakagawa T., Yuan J., 2000; Wu C. et al., 2010). В ходе проведенных исследований нами было установлено достоверно значимое увеличение активности фермента в лимфоцитах крови, инкубированных в присутствии 0,5 мМ Н₂О₂, и снижение – в интактных опухолевых клетках линии Jurkat на фоне увеличения концентрации АФК и гидроксильного радикала, по сравнению с показателями в интактных лимфоцитах крови (таблица 4). Выявленное разнонаправленное поведение фермента в лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro* и в интактных опухолевых клетках линии Jurkat позволяет предположить наличие особенностей в молекулярных механизмах регуляции активности этого белка. Полученные нами данные косвенно подтверждают результаты D.A. Mitchell и соавторов (2007), которые показали в опухолевых клетках линии Jurkat апоптоз-ингибирующий эффект тиоредоксина на прокаспазу-3 (Mitchell D.A. et al., 2007).

При изучении таких белков-регуляторов апоптоза, как NF-κB и Araf-1 нами было получено достоверно значимое увеличение их содержания в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, по сравнению с концентрацией в интактных лимфоцитах крови. На наличие редокс-регулируемого механизма активации Araf-1 при опухолевой прогрессии указывала установленная нами с помощью корреляционного анализа положительная взаимосвязь между величиной соотношения GSH/GSSG и содержанием транскрипционного фактора Araf-1 (r = +0,89; p<0,05) в интактных опухолевых клетках линии Jurkat.

Реализация запрограммированной гибели в клетках во многом сводится к изменению направленности ферментативных реакций, активации/инактивации факторов транскрипции в результате белок-белковых взаимодействий (Nahálková J., 2015; Guo Z. et al., 2016). Вследствие чрезмерной генерации АФК неизбежно происходит повреждение белков-регуляторов и белков-эффекторов апоптоза,

которые нуждаются в своевременном рефолдинге (Jomova K., Valko M., 2011; Borges C.R., Lake D.F., 2014; Farooqi A.A. et al., 2015).

Белки теплового шока относятся к молекулам, синтез которых индуцируется стрессом (Mjahed H. et al., 2012). Ведущим участником рефолдинга протеинов принято считать Hsp70 (Wang X. et al., 2014). Он играет большую роль в распознавании поврежденных белков с целью их дальнейшей репарации или деградации, в том числе убиквитин-зависимой. Шаперонная активность Hsp27 проявляется в образовании комплекса с субстратами, которые подверглись частичной денатурации или имели неправильную конформацию молекулы, с последующим его взаимодействием с АТФ-зависимыми шаперонами, в основном Hsp70 и Hsp90 (Wang X. et al., 2014; Lianos G.D. et al., 2015). Кроме этого, Hsp относят к молекулам, которые оказывают модулирующий эффект на реализацию апоптоза (Mjahed H. et al., 2012; Wang X. et al., 2014; Bakthisaran R. et al., 2015).

В ходе проведенного исследования нами было установлено достоверно значимое увеличение содержания Hsp27 и Hsp70 в интактных опухолевых клетках линии Jurkat относительно показателей в интактных лимфоцитах крови; кроме этого, опухолевые клетки характеризовались достоверно значимым возрастанием концентрации Hsp70, по сравнению с результатами, полученными при исследовании лимфоцитов крови при ОС *in vitro* (таблица 8). Проведенный корреляционный анализ полученных результатов в интактных опухолевых клетках линии Jurkat позволил установить отрицательную взаимосвязь между количеством Fas-положительных клеток и содержанием Hsp27 ($r = -0,83$; $p < 0,05$). Вероятнее всего, установленный факт указывал на то, что повышенное содержание Hsp27 позволяло опухолевым клеткам линии Jurkat включать механизмы ингибирования апоптоза, что проявлялось в виде снижения презентации Fas-рецептора. Полученные нами результаты гиперпродукции Hsp27 в опухолевых клетках линии Jurkat, по сравнению с лимфоцитами крови, согласуются с данными литературы (Ciocca D.R., Calderwood S.K., 2005; Рязанцева Н.В. и др., 2012; Bakthisaran R. et al., 2015; Zhang S. et al., 2015). Наличие высокого уровня Hsp70 может ассоциироваться с низкой степенью дифференцировки опухолевых клеток, способностью к метастазированию в лимфатические узлы и ингибированием апоптоза (Ciocca D.R., Calderwood S.K., 2005; Wang X. et al., 2014). Так, проведенный нами корреляционный анализ полученных результатов в интактных опухолевых клетках линии Jurkat позволил установить положительную взаимосвязь между содержанием транскрипционного фактора Araf-1 и Hsp70 ($r = +0,83$; $p < 0,05$). Вероятнее всего, гиперпродукция Hsp70 позволяла ингибировать проапоптотический эффект Araf-1 и, тем самым, способствовала «ускользанию» опухолевых клеток линии Jurkat от запрограммированной гибели.

Исследования в области патофизиологии и биохимии, посвященные роли компонентов тиолдисульфидной системы, ОМБ и убиквитин-зависимого пути деградации протеинов в регуляции запрограммированной гибели опухолевых клеток, имеют особую значимость для выявления молекулярных мишеней таргетной терапии злокачественных новообразований.

На основании результатов исследования, проведенного нами на модели ОС *in vitro* в лимфоцитах крови, можно сделать вывод, что компоненты тиолдисульфидной системы и ОМБ задействованы в регуляции и реализации как рецептор-

опосредованного, так и митохондриального пути апоптоза изучаемых клеток. Но, несмотря на то, что гиперпродукция АФК в клетках описывается как маркер апоптоза (Inoue T., Suzuki-Karasaki Y., 2013; Platkov M. et al., 2014; Kesarwani P. et al., 2015; Zhang G.L. et al., 2015), роль редокс-статуса, ОМБ и убиквитин-зависимой деградации протеинов в регуляции программированной гибели при опухолевой прогрессии остаются до конца не изученными.

В ходе настоящего исследования четко показано активирующее действие АФК на запуск апоптоза и активацию каспазы-3 в лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro*. Напротив, в опухолевых клетках линии Jurkat гиперпродукция АФК сопровождалась, наоборот, активным ингибированием апоптоза. Кроме того, полученные результаты позволяют сделать предположение о возможном участии глутатионилирования и убиквитинилирования в регуляции презентации TNF RI и Fas-рецепторов на плазматической мембране, активности NF-κB, Araf-1 и каспазы-3 в опухолевых клетках линии Jurkat.

Таким образом, дизрегуляция механизмов программированной гибели при опухолевой прогрессии опосредована изменением редокс-статуса, нарушением функционирования тиолдисульфидной системы и окислительной модификацией белков-регуляторов и белков-эффекторов апоптоза на фоне сформированного ОС.

Роль компонентов тиолдисульфидной системы, окислительной модификации белков и убиквитин-зависимой деградации в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat

Для выяснения молекулярных механизмов участия ОМБ и убиквитин-зависимого пути деградации протеинов, компонентов тиолдисульфидной системы в дизрегуляции апоптоза при опухолевом росте, на следующем этапе исследования нами было выполнено моделирование редокс-статуса опухолевых клеток линии Jurkat.

Нами была установлена усиленная продукция АФК и гидроксильного радикала в опухолевых клетках линии Jurkat при добавлении в среду культивирования DEX или NEM, или BSO, или KRIBB3, а в присутствии DTE были получены сопоставимые значения изучаемых показателей относительно значений в интактных клетках (рисунок 2). Но, при всех описанных воздействиях нами было установлено достоверно значимое увеличение числа аннексин-положительных опухолевых клеток линии Jurkat по сравнению с количеством интактных опухолевых клеток (рисунок 3). Поэтому целесообразным представилось более детально изучить процессы реализации и регуляции апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat.

До сих пор нет однозначного мнения о роли антиоксидантного статуса, системы глутатиона и тиоредоксина в редокс-зависимых механизмах опухолевой трансформации клеток (Kesarwani P. et al., 2013; An N., Kang Y., 2014; Glasauer A., Chandel N.S., 2014; Harris I.S. et al., 2015; Manda G. et al., 2015). Рядом авторов показано, что ингибирование синтеза GSH *de novo* с помощью BSO в нормальных клетках сопровождалось снижением вероятности малигнизации клетки. А применение BSO в опухолевой клетке активировало ее вступление в апоптоз (Harris I.S. et al., 2015). Представленное исследование было направлено на оценку

молекулярных взаимосвязей между изменениями состояния тиолдисульфидной системы и активности белков, принимающих участие в апоптозе опухолевых клеток линии Jurkat.



Рисунок 2 – Содержание активных форм кислорода (метод проточной лазерной цитофлуориметрии), гидроксильного радикала (метод спектрофотометрии) в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и при различных условиях культивирования

Здесь и далее в рисунках 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11: * – уровень статистической значимости различий по сравнению с интактными опухолевыми клетками линии Jurkat ($p < 0,05$), # – уровень статистической значимости различий по сравнению с опухолевыми клетками линии Jurkat+DEX ($p < 0,05$), ♦ – уровень статистической значимости различий по сравнению с опухолевыми клетками линии Jurkat+NEM/DTE/BSO/KRIBB3 ($p < 0,05$); 1 – интактные опухолевые клетки линии Jurkat, 2 – опухолевые клетки линии Jurkat+NEM, 3 – опухолевые клетки линии Jurkat+DTE, 4 – опухолевые клетки линии Jurkat+BSO, 5 – опухолевые клетки линии Jurkat+KRIBB3, 6 – опухолевые клетки линии Jurkat+DEX, 7 – опухолевые клетки линии Jurkat+DEX+NEM, 8 – опухолевые клетки линии Jurkat+DEX+DTE, 9 – опухолевые клетки линии Jurkat+DEX+BSO, 10 – опухолевые клетки линии Jurkat+DEX+KRIBB3

При изучении уровня восстановленной и окисленной формы тиола в опухолевых клетках линии Jurkat нами было получено достоверно значимое снижение концентрации GSH при внесении как блокатора SH-групп пептидов и протеинов, ингибитора синтеза трипептида *de novo*, так и протектора SH-групп пептидов и белков по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках (рисунок 4).

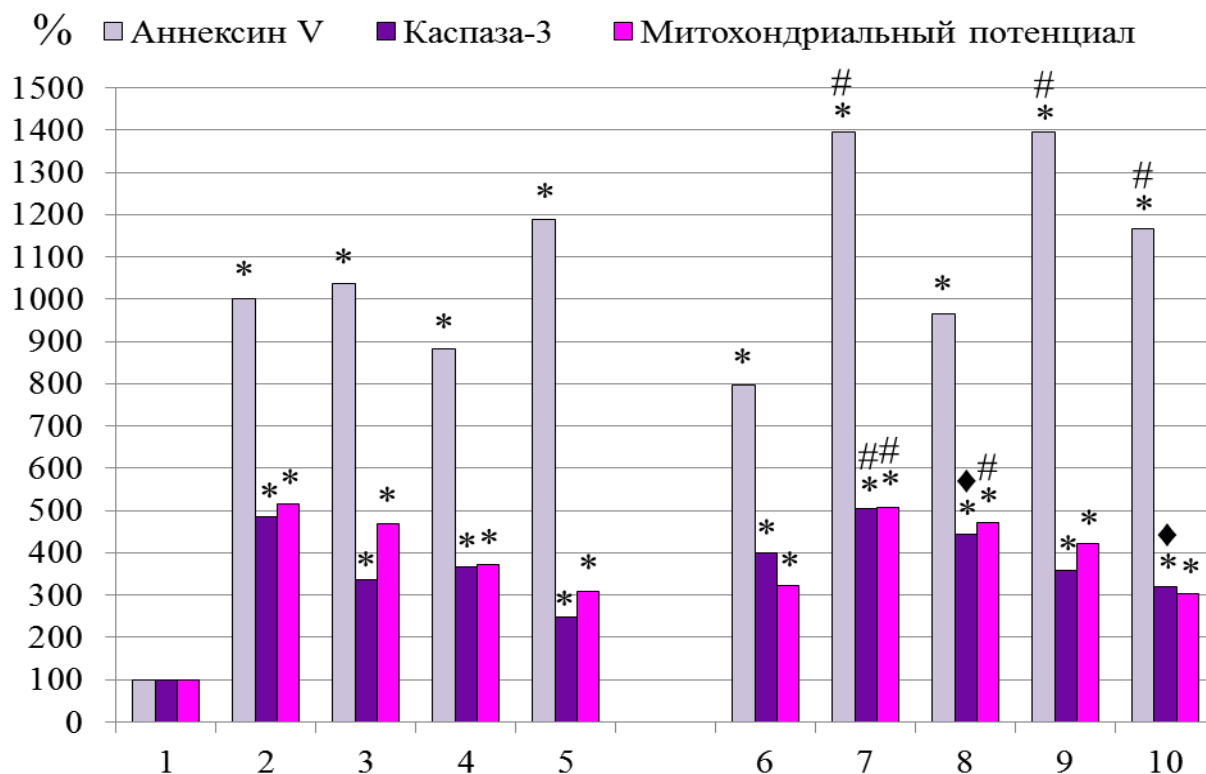


Рисунок 3 – Активность каспазы-3, количество клеток со сниженным митохондриальным потенциалом и аннексин-положительных интактных опухолевых клеток линии Jurkat и при различных условиях культивирования

Следует отметить, что ингибирование Hsp27 с помощью KRIBB3 и индукция апоптоза – DEX в опухолевых клетках линии Jurkat характеризовались сопоставимыми значениями содержания GSH в интактных опухолевых клетках (рисунок 4). Кроме этого, возрастание концентрации GSSG в опухолевых клетках линии Jurkat по сравнению с результатом в интактных опухолевых клетках вызывало ингибирование Hsp27 (рисунок 4). Добавление DEX к редокс-модуляторам или ингибитору Hsp27 в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat сопровождалось еще большим снижением содержания GSH и GSSG по сравнению с показателем в интактных опухолевых клетках (рисунок 4).

В ходе проведенного исследования нами было установлено достоверно значимое снижение активности ГР и сопоставимые показатели активности ГПО и ТРР в опухолевых клетках линии Jurkat при блокировании SH-групп пептидов и протеинов по сравнению с показателем в интактных опухолевых клетках. На достоверно значимое снижение концентрации GSH, в этом случае воздействия на опухолевые клетки линии Jurkat, влияла низкая активность ГР. В случае применения DTE или BSO в опухолевых клетках линии Jurkat нами были получены сопоставимые результаты активности ГР и ГПО, а также достоверно значимое снижение активности ТРР по сравнению с интактными опухолевыми клетками. При внесении в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat индуктора апоптоза и/или ингибитора Hsp27 нами было получено достоверно значимое увеличение активности ГР и снижение активности ТРР относительно показателей в интактных опухолевых клетках (рисунок 5).

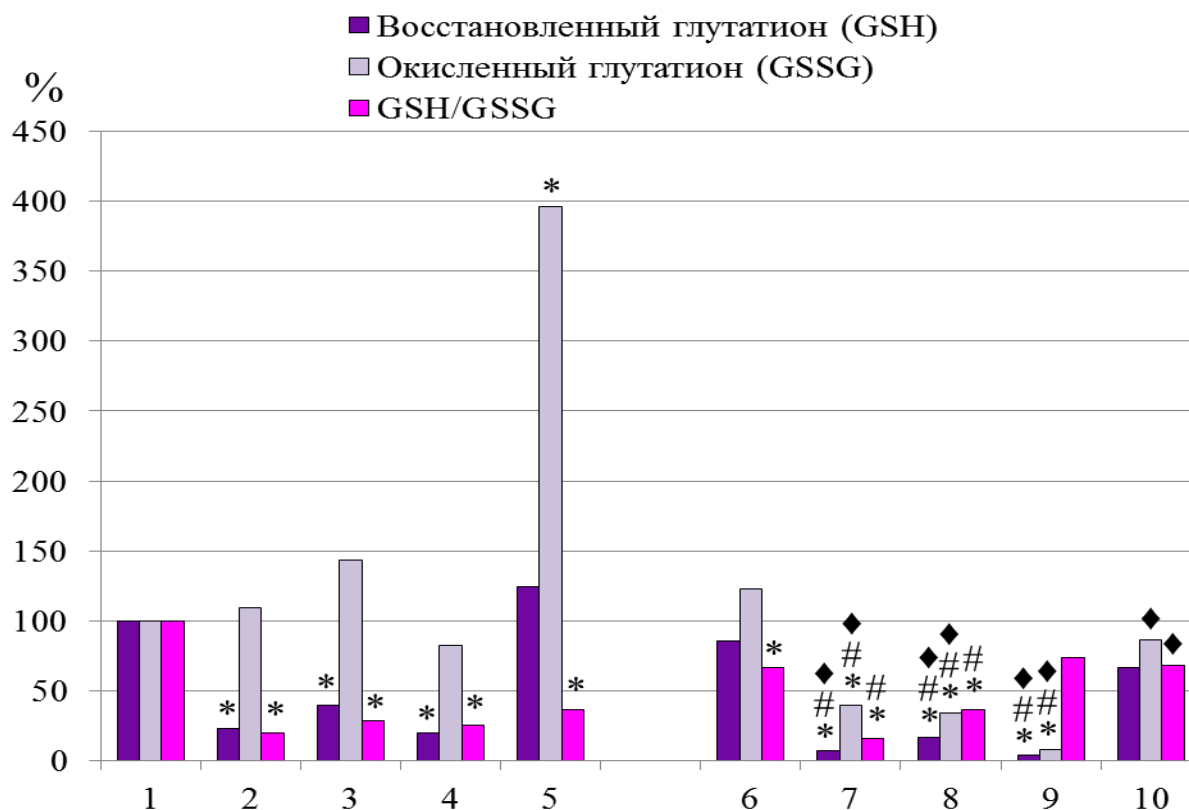


Рисунок 4 – Содержание восстановленного, окисленного глутатиона, величина их соотношения в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и при различных условиях культивирования

Установленный факт снижения активности ГРР на фоне повышения активности ГР может быть связан с усиленным отвлечением НАДФН в процесс восстановления GSSG и пополнения пула GSH, так как именно повышенная активность ГР позволила поддерживать содержание GSH, а, следовательно, и активность ГПО, которая использовала его в качестве одного из субстратов своей реакции, на сопоставимом уровне с показателями в интактных опухолевых клетках. Кроме этого, необходимо отметить, что ни при редокс-модуляции, ни при ингибировании Hsp27 в опухолевых клетках линии Jurkat нами не установлено достоверно значимых различий в активности ГПО по сравнению со значением в интактных опухолевых клетках (рисунок 5).

Важно отметить, что внесение в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat DEX и NEM, DEX и BSO приводило к дисбалансу состояния тиолдисульфидной системы и вовлечению изучаемых клеток в апоптоз (рисунки 3, 4, 5).

При изучении роли изменения редокс-статуса клеток, концентрации глутатиона и Hsp27 в механизмах рецептор-опосредованной активации апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat нами было установлено стимулирующее влияние на презентацию TNF RI и Fas-рецепторов применения DEX и/или NEM, BSO, KRIBB3; кроме этого, в случае внесения DTE в культуральную среду, происходила только стимуляция экспрессии Fas-рецепторов по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках (рисунок 6).

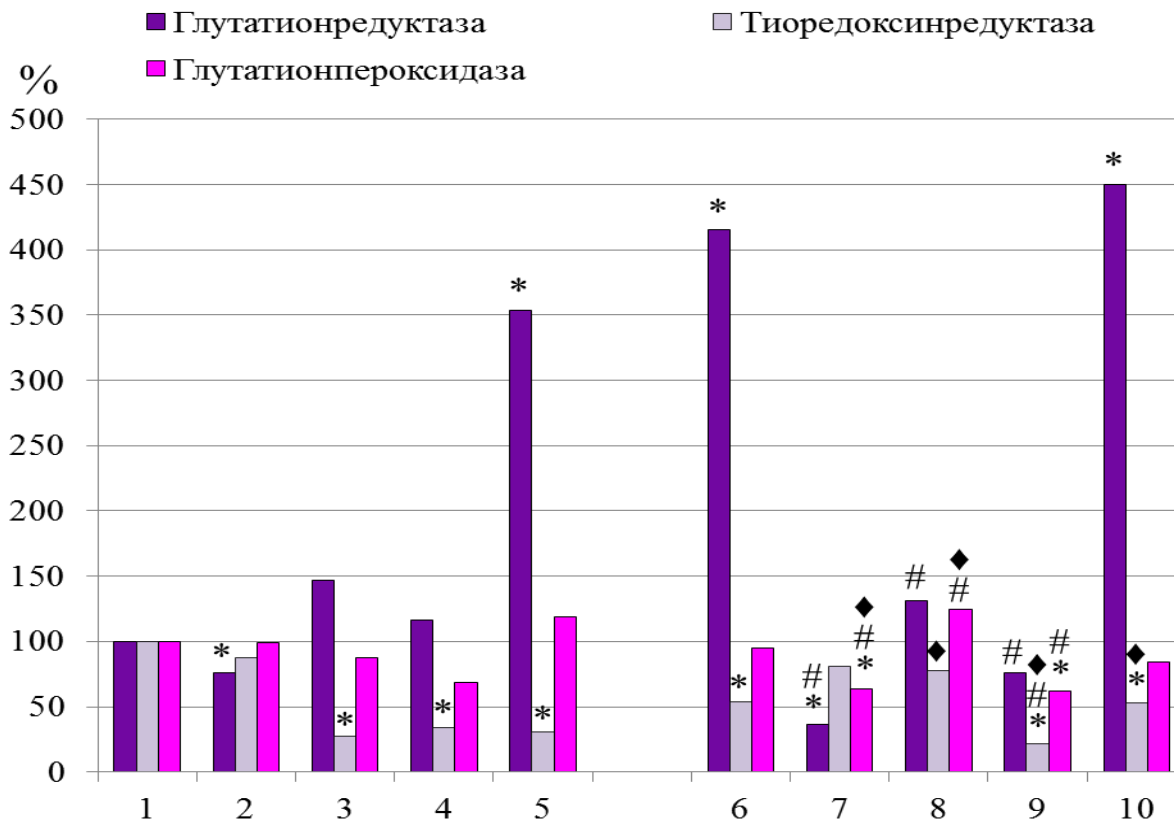


Рисунок 5 – Активность глутатионредуктазы, тиоредоксинредуктазы, глутатионпероксидазы в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и при различных условиях культивирования

На прямое участие в механизме презентации TNF RI редокс-статуса указывало наличие отрицательной корреляционной взаимосвязи между величиной соотношения GSH/GSSG и числом TNF RI-положительных опухолевых клеток линии Jurkat в условиях индукции апоптоза с помощью DEX ($r = -0,94$; $p < 0,05$). Таким образом, можно предположить, что основой редокс-сигналикации являются свободные сульфгидрильные группы рецепторных молекул. При определении числа опухолевых клеток со сниженным митохондриальным потенциалом в условиях применения DEX и/или NEM, DTE, BSO, KRIBB3 нами было установлено достоверно значимое увеличение показателя по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках (рисунок 3). Это доказывало наличие «утечки» электронов из цепи переноса электронов митохондрий, что приводило к повышению уровня АФК, в том числе и гидроксильного радикала в опухолевых клетках линии Jurkat.

Запуск программированной гибели клеток требует кооперации целого ряда молекул: рецепторов, белков-регуляторов и белков-эффекторов. В условиях применения NEM или DTE, или BSO, или KRIBB3 в опухолевых клетках линии Jurkat нами было получено увеличение концентрации NF-κB по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках. Увеличение содержания Araf-1 зафиксировано в случае присутствия в среде культивирования опухолевых клеток линии Jurkat индуктора апоптоза и блокатора SH-групп пептидов и белков, а при внесении протектора SH-групп пептидов и протеинов, ингибитора

синтеза глутатиона *de novo*, а также Hsp27 – установлено достоверно значимое снижение содержания изучаемого белка-регулятора апоптоза по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках (рисунок 7). При проведении корреляционного анализа показателей опухолевых клеток линии Jurkat в условиях присутствия в среде культивирования DTE нам удалось установить положительную взаимосвязь между содержанием белково-связанного глутатиона и NF-κB ($r = +0,89$; $p < 0,05$). Установленный факт взаимосвязи может свидетельствовать об участии глутатионилирования в активации этого фактора транскрипции.

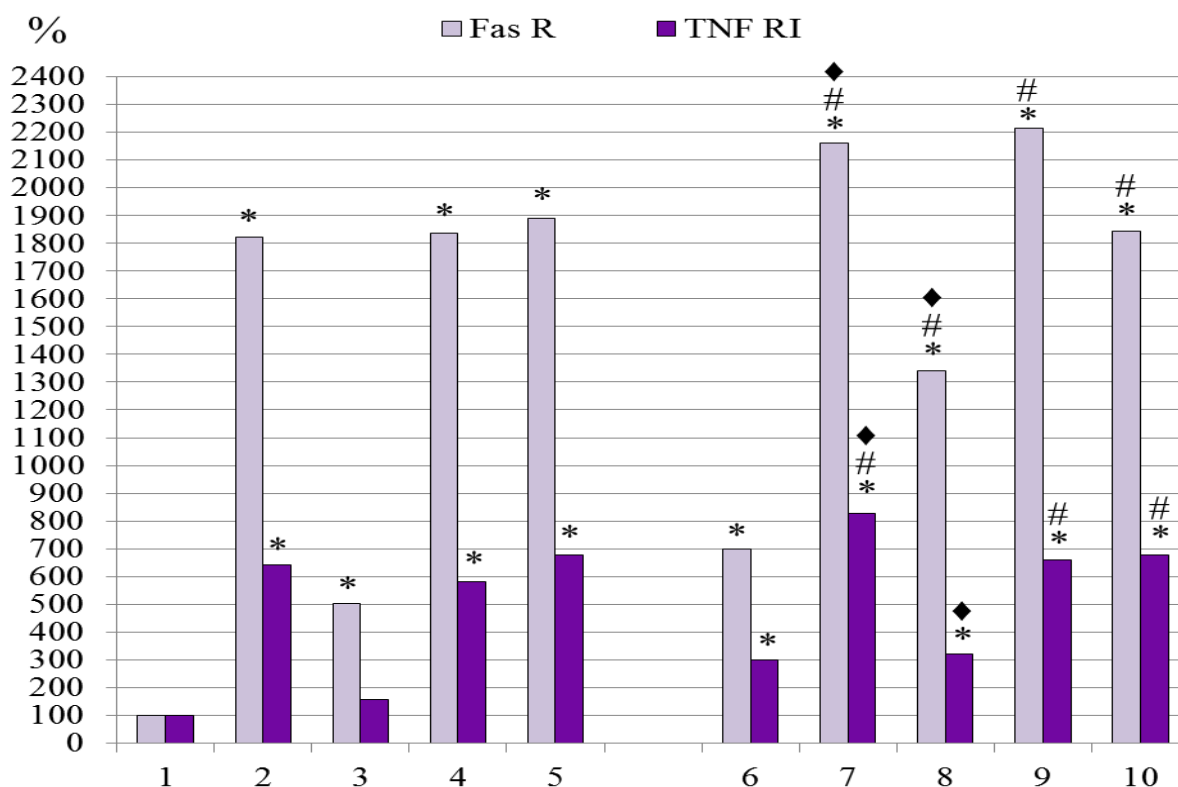


Рисунок 6 – Количество Fas-, TNF RI-положительных интактных опухолевых клеток линии Jurkat и при различных условиях культивирования

Оценку завершенности апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat в условиях применения ингибиторного анализа проводили с помощью анализа активности каспазы-3. Так, нами был установлен активирующий эффект на каспазу-3 как модуляции редокс-статуса, так и ингибирования Hsp27 (рисунок 3). G.L. Zhang и соавторы (2015) установили у глутатиона ингибирующий эффект на активность каспазы-3 в опухолевых клетках линии Jurkat (Zhang G.L. et al., 2015). А С. Wu и соавторы (2010) показали участие тиоредоксина и TRP в регуляции каспазы-3 в клетках HeLa путем S-нитрозилирования и денитрозилирования (Wu C. et al., 2010).

Нами было зафиксировано увеличение содержания транскрипционного фактора Araf-1 и активности каспазы-3 относительно показателей в интактных опухолевых клетках в случае действия блокатора SH-групп пептидов и протеинов или индуктора апоптоза, что позволило предположить активацию митохондриального пути программированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat. При внесении в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat

протектора SH-групп пептидов и белков, ингибитора Hsp27 или синтеза глутатиона *de novo* этот эффект отсутствовал, так как происходило увеличение активности каспазы-3 на фоне снижения концентрации проапоптотического фактора транскрипции (Araf-1) и повышения содержания антиапоптотического белка-регулятора апоптоза – NF-κB (рисунок 3).

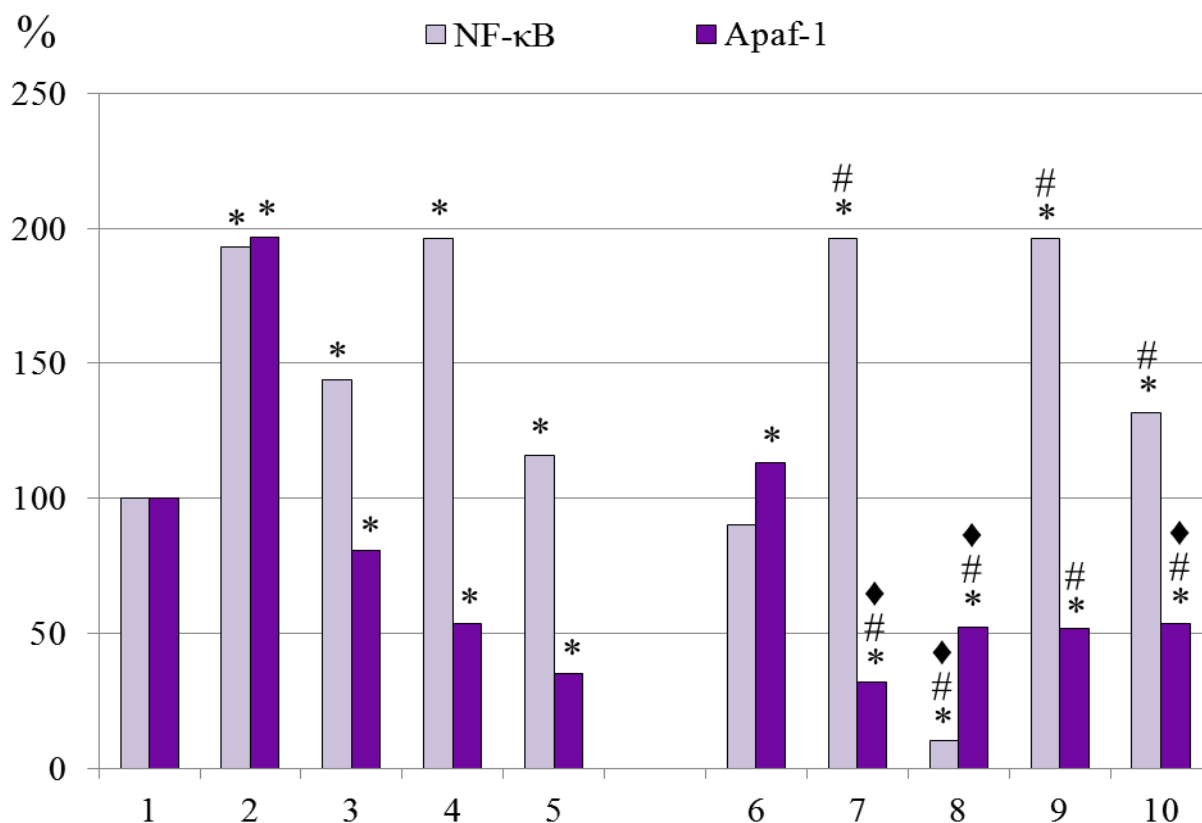


Рисунок 7 – Содержание факторов транскрипции (NF-κB, Araf-1) в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и при различных условиях культивирования

Основные процессы, определяющие метаболизм и функциональную активность клеток, обеспечиваются за счет белковых мультиферментных комплексов, в том числе запуск и реализация запрограммированной гибели. Устойчивость к действию проапоптотических факторов – одна из главных особенностей опухолевых клеток. Кроме этого, отсутствие чувствительности опухолевых клеток к триггерным механизмам запрограммированной гибели основано на их способности успешно существовать в условиях ОС. Данное исследование обусловлено поиском взаимосвязей между нарушениями редокс-статуса, ОМБ, их деградацией и дисрегуляцией апоптотической гибели в условиях ОС при опухолевой прогрессии. Мишенью АФК, в первую очередь, являются белковые молекулы клетки – ферменты, белки цитоскелета, рецепторы, факторы транскрипции и т. д. (Dansen T.V. et al., 2009; Moghaddam A.E. et al., 2011; Wehr N.V., Levine R.L., 2013). В силу особенностей своего строения белковые молекулы являются потенциальными ловушками АФК, а внутриклеточный уровень ОМБ фактически отражает соотношение между скоростью окисления белков и скоростью деградации окисленных протеинов. В связи с разнообразным химическим строением и особенностями пространственной

структурной организации белковых молекул, процесс окислительной модификации протеинов сложен.

Эффективность окислительной модификации цистеиновых остатков определяется их низким потенциалом ионизации и в значительной степени зависит от структурной организации белковой молекулы (Дубинина Е.Е., Дадали В.А., 2010). В ходе окисления цистеинового остатка последовательно образуются производные сульфеновой, сульфиновой и сульфоновой кислот. Сульфеновые производные могут либо окисляться дальше до сульфиновых, либо образовывать смешанные эфиры с цистеином или глутатионом (Лушак В.И., 2007; Lennicke C. et al., 2015). В отличие от карбонилирования протеинов и окисления остатков других аминокислот, окисление цистеинового остатка является обратимым процессом. Дисульфидная связь может быть восстановлена с участием глутаредоксинов. Возможность циклического окисления-восстановления остатков цистеина в белках составляет молекулярную основу их функционирования в качестве регуляторов внутриклеточных процессов (Stadtman E.R., Levine R.L., 2000; Thannickal V.J., Fanburg B.L., 2000; Dansen T.B. et al., 2009; Hill B.G., Bhatnagar A., 2012).

В ходе проведенного исследования в опухолевых клетках линии Jurkat нами было показано достоверно значимое снижение концентрации белково-связанного глутатиона при внесении в среду инкубации индуктора апоптоза, ингибитора синтеза GSH *de novo*, а также Hsp27 по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (рисунок 7). А также, аналогичный эффект был зафиксирован при добавлении в среду культивирования DEX и NEM, DEX и BSO, DEX и DTE, DEX и KRIBB3 по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (рисунок 7). Так, при ингибировании синтеза GSH *de novo* или блокировании SH-групп пептидов и протеинов в опухолевых клетках линии Jurkat нами получено ожидаемое снижение определяемого показателя, а ингибированием Hsp27 в изучаемых клетках было косвенно доказано участие этого шаперона в снижении интенсивности глутатионилирования белков (рисунок 7).

При оценке содержания КПБ в опухолевых клетках линии Jurkat было установлено, что достоверно значимое снижение показателя регистрировалось только в случае присутствия в среде культивирования DTE, а при добавлении в среду инкубации DEX и/или NEM, BSO, KRIBB3 происходило повышение концентрации КПБ относительно значений в интактных опухолевых клетках (рисунок 8). Кроме этого, в опухолевых клетках линии Jurkat при внесении в среду культивирования DTE, DTE и DEX нами было установлено достоверно значимое снижение концентрации окисленного триптофана и битирозина по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (рисунок 8).

Достоверно значимым снижением содержания окисленного триптофана, относительно значения в интактных опухолевых клетках, также характеризовались опухолевые клетки линии Jurkat культивированные в присутствии BSO или KRIBB3 и при внесении BSO и DEX, NEM и DEX (рисунок 9). Повышение содержания КПБ могло быть связано с дисбалансом в работе ферментов антиоксидантной защиты, а именно со снижением активности ГПО, что приводило к повышению уровня гидроксильного радикала. При этом в описанных условиях культивирования в опухолевых клетках линии Jurkat наиболее

интенсивно происходила необратимая окислительная модификация протеинов. Белки, которые подверглись карбонилированию, образуют агрегаты и фрагментируются.

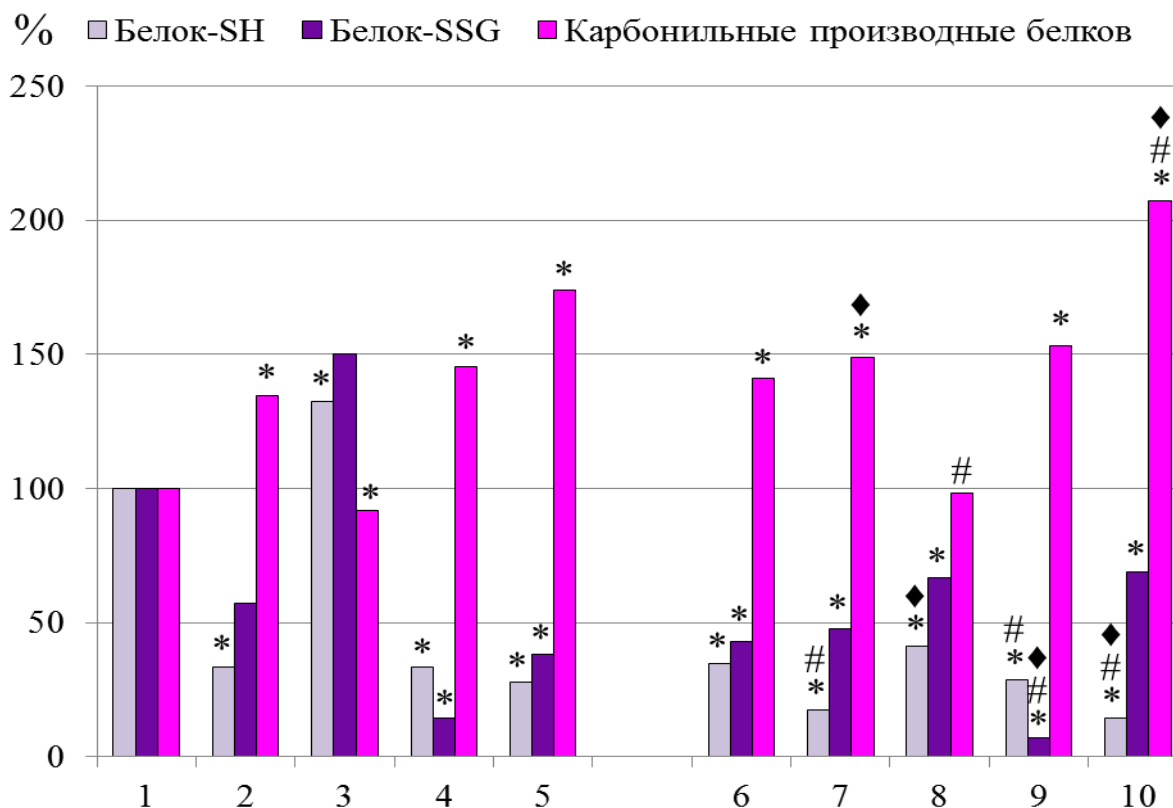


Рисунок 8 – Содержание SH-групп белков (белок-SH), белково-связанного глутатиона (белок-SSG), карбонильных производных протеинов в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и при различных условиях культивирования

На прямое участие ингибирования синтеза GSH *de novo* в активации карбонилирования протеинов указывало наличие отрицательной корреляционной взаимосвязи между величиной соотношения GSH/GSSG и содержанием КПБ в опухолевых клетках линии Jurkat при внесении в культуральную среду BSO ($r = -0,83$; $p < 0,05$).

При сопоставлении показателей, характеризующих ОМБ с результатами реализации и регуляции программной гибели опухолевых клеток линии Jurkat нами были получены положительные корреляционные взаимосвязи между содержанием окисленного триптофана и числом Fas-положительных клеток ($r = +0,89$; $p < 0,05$), концентрацией окисленного триптофана и транскрипционного фактора Араf-1 ($r = +0,89$; $p < 0,05$) в условиях присутствия в среде культивирования DEX; между концентрацией окисленного триптофана и числом TNF RI-положительных клеток ($r = +0,83$; $p < 0,05$) в условиях добавления в среду культивирования DTE. Кроме этого, в опухолевых клетках линии Jurkat нами были установлены отрицательные корреляционные взаимосвязи между концентрацией окисленного триптофана и транскрипционного фактора NF-κB ($r = -0,83$; $p < 0,05$), содержанием КПБ и транскрипционного фактора NF-κB ($r = -0,89$; $p < 0,05$) в условиях присутствия в среде культивирования DTE; между содержанием битирозина и

транскрипционного фактора NF-κB ($r = -0,94$; $p < 0,05$) при внесении в среду культивирования KRIBB3.

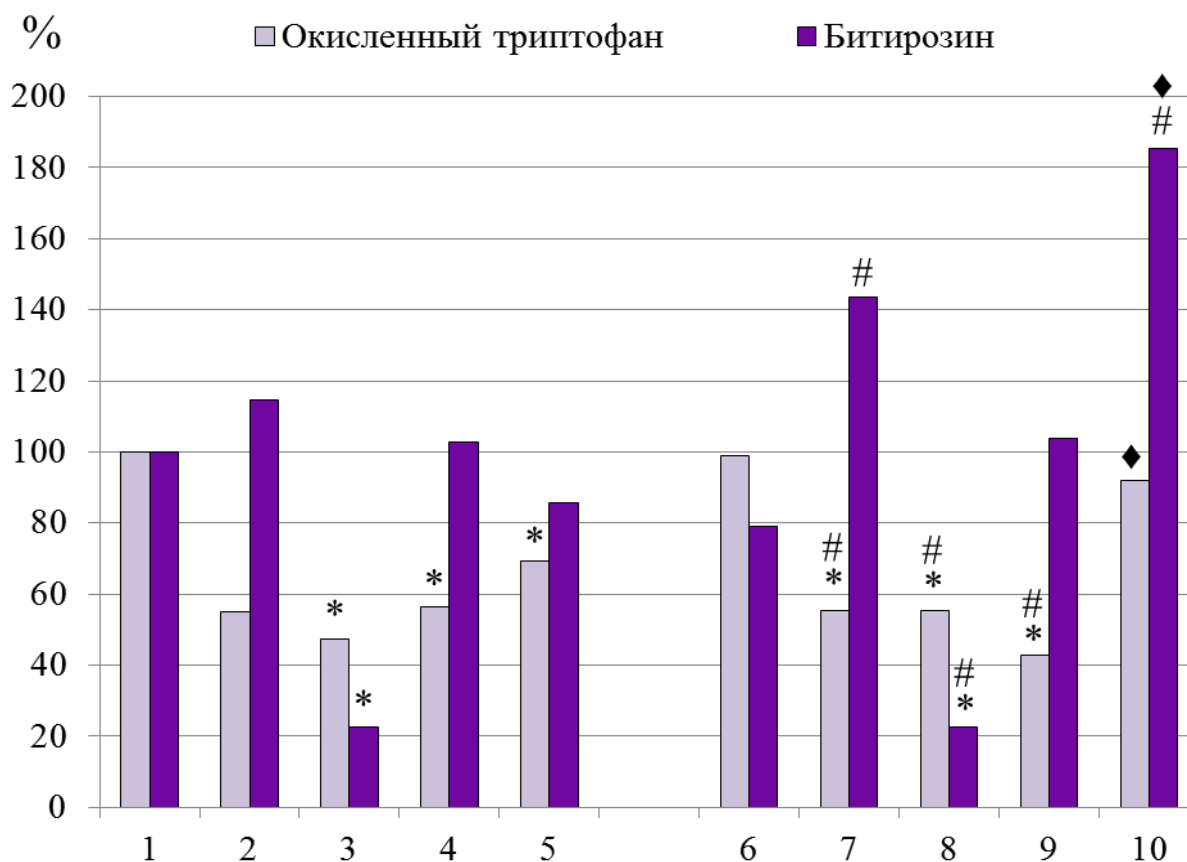


Рисунок 9 – Содержание битириозина, окисленного триптофана в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и при различных условиях культивирования

Одной из причин выживания злокачественных клеток является повышенный уровень экспрессии в них белков теплового шока (Stetler R.A., 2009; Рязанцева Н.В. и др., 2012; Ye S. et al., 2014). Механизмы модуляции апоптоза в опухолевых клетках с помощью белков теплового шока различны. Так, например, шапероны способны препятствовать активации каспаз, связываться непосредственно с цитоплазматической фракцией цитохрома С и транскрипционным фактором Araf-1 и, тем самым, блокировать образование апоптосомы (Beere H.M., 2004). Кроме этого, в условиях ОС в опухолевых клетках линии Jurkat неизбежно происходит окислительное повреждение белковых молекул, которые нуждаются в рефолдинге при участии шаперонов.

В ходе проведенного исследования в опухолевых клетках линии Jurkat нами было зарегистрировано достоверно значимое увеличение концентрации Hsp27 при добавлении в среду инкубации DTE либо NEM и DEX, BSO и DEX, KRIBB3 и DEX, а снижение – в присутствии DEX или NEM, или KRIBB3 относительно показателей в интактных опухолевых клетках (рисунок 9).

Внесение DEX и/или NEM, DTE, BSO в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat сопровождалось однонаправленным эффектом – достоверно значимым снижением содержания Hsp70 по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках (рисунок 10).

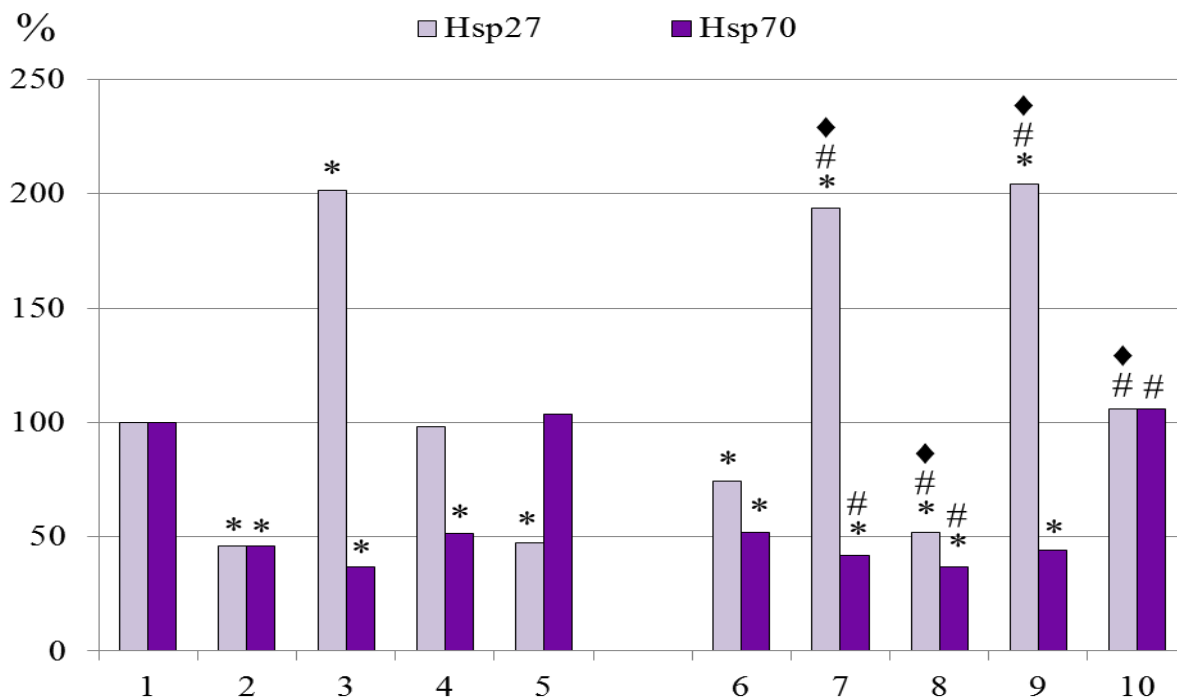


Рисунок 10 – Содержание белков теплового шока 27, 70 в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и при различных условиях культивирования

Выполненный корреляционный анализ позволил нам выдвинуть предположение о влиянии редокс-статуса и рефолдинга на ОМБ в опухолевых клетках линии Jurkat посредством установленной тесной положительной взаимосвязи между содержанием белково-связанного глутатиона и концентрацией Hsp27 ($r = +0,83$; $p < 0,05$) в условиях присутствия в среде культивирования NEM. Последний факт указывает на то, что при снижении содержания Hsp27 процесс глутатионилирования протеинов протекал менее активно.

Таким образом, в опухолевых клетках линии Jurkat воздействие DTE вызывало не только выраженное протекторное влияние на процессы ОМБ, но и, вероятно, глутатионилирование функциональных редокс-чувствительных SH-групп цистеина в ферментах тиолдисульфидной системы и белках-регуляторах апоптоза, способствуя их активации (Dansen T.B. et al., 2009). Изменение редокс-статуса изучаемых клеток при блокировании SH-групп пептидов и белков сопровождалось образованием ковалентных модификаций аминокислот, с последующим карбонилированием протеинов. Карбонилирование аминокислотных остатков является модификацией на уровне первичной структуры белка, что способствует агрегации и фрагментации белковых молекул (Bollineni R.C. et al., 2013). Следствием таких структурных повреждений является, в частности, резкое повышение чувствительности белков к протеолитической деградации протеазами и активация апоптоза опухолевых клеток (Меньщикова Е.Б. и др., 2008; Муравлева Л.Е. и др., 2010).

Доказательством активации убиквитин-зависимой деградации протеинов в опухолевых клетках линии Jurkat было зафиксированное нами достоверно значимое снижение содержание убиквитина при внесении в среду культивирования индуктора апоптоза и/или редокс-модуляторов, а также ингибитора Hsp27, синтеза глутатиона

de novo по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках (рисунок 11). Следует отметить, что содержание убиквитинлигазы при указанных условиях культивирования менялось разнонаправленно. Так, в опухолевых клетках линии Jurkat нами было установлено достоверно значимое снижение содержания убиквитинлигазы в случае присутствия в культуральной среде DTE или BSO, NEM и DEX, DTE и DEX, а увеличение концентрации фермента вызывали DEX или NEM, или KRIBB3 относительно показателей в интактных опухолевых клетках (рисунок 10).

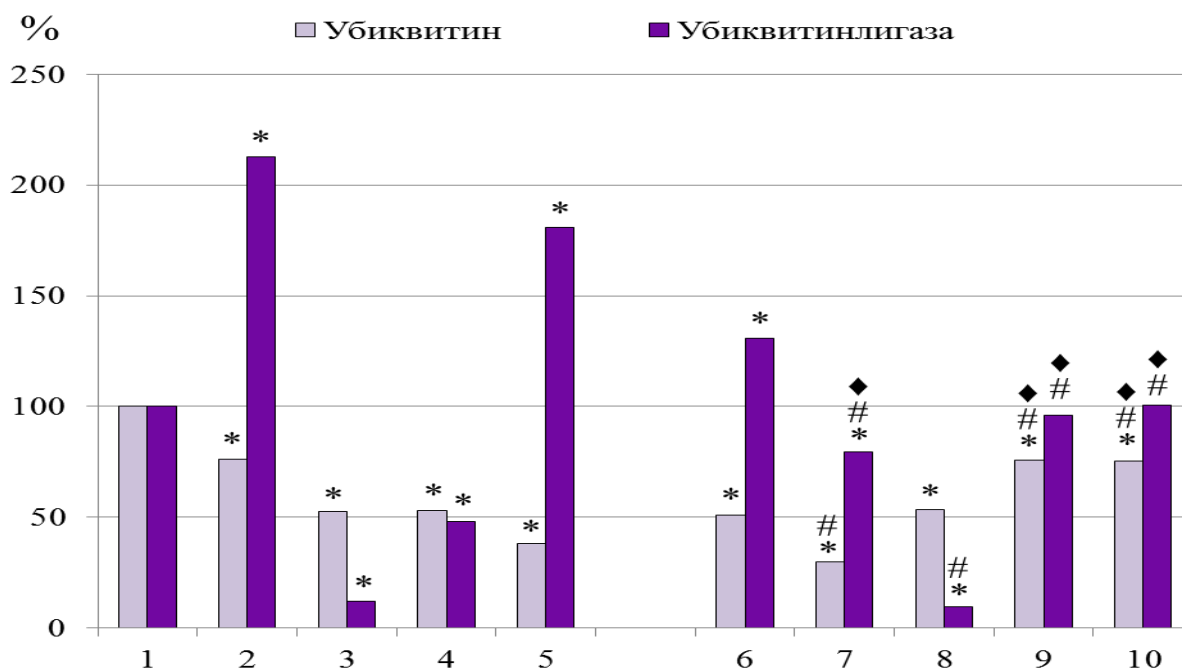


Рисунок 11 – Содержание убиквитина, убиквитинлигазы в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и при различных условиях культивирования

При проведении корреляционного анализа полученных результатов в опухолевых клетках линии Jurkat нами были установлены тесные положительные взаимосвязи между содержанием Hsp27 и концентрацией убиквитина ($r = +0,83$; $p < 0,05$) при внесении в среду культивирования NEM; величиной GSH/GSSG и содержанием убиквитинлигазы ($r = +0,99$; $p < 0,05$) в условиях присутствия в среде культивирования DTE; величиной GSH/GSSG и содержанием убиквитина ($r = +0,83$; $p < 0,05$) в условиях добавления в среду культивирования BSO. Кроме этого, в опухолевых клетках линии Jurkat нами были выявлены тесные отрицательные взаимосвязи между активностью каспазы-3 и концентрацией убиквитина ($r = -0,94$; $p < 0,05$) при внесении в среду культивирования NEM.

Однонаправленное снижение содержания Hsp70, убиквитина и убиквитинлигазы в опухолевых клетках линии Jurkat при действии протектора SH-групп пептидов и протеинов было отражено в виде тесной положительной взаимосвязи между концентрацией Hsp70 и убиквитина ($r = +0,83$; $p < 0,05$).

Таким образом, в ходе проведенного исследования нами была установлена роль тиолдисульфидной системы в регуляции программированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat, а именно, доказана взаимосвязь увеличения

презентации TNF RI и Fas-рецепторов, изменения содержания проапоптотического (Araf-1) и антиапоптотического (NF-κB) факторов транскрипции, активности каспазы-3 и количества аннексин-положительных опухолевых клеток в условиях внутриклеточного редокс-модулирования при участии GSH.

В целом, полученные нами результаты представляют собой теоретическую основу для последующей разработки методов селективной коррекции дизрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии, связанной с формированием ОС.

Заключение

Одним из звеньев патогенеза опухолевого роста является дизрегуляция запрограммированной гибели клеток на фоне формирования ОС (Меньщикова Е.Б. и др., 2008; Boland M.L. et al., 2013; Green D.R. et al., 2014). В настоящее время АФК рассматривают как с позиции повреждения биополимеров клетки, так и в качестве компонентов внутриклеточной сигнальной системы (Morgan M.J. et al., 2008; Зенков Н.К. и др., 2009; Scialo F. et al., 2013). Исследования последних лет связаны с выяснением роли компонентов тиолдисульфидной системы в регуляции экспрессии генов, активности ферментов и факторов транскрипции, внутриклеточной сигнализации апоптоза и других процессов (Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 2010; Степовая Е.А. и др., 2010; Lu J., Holmgren A., 2012; Sengupta R., Holmgren A., 2012; Hanschmann E.M. et al., 2013; Dannenmann V. et al., 2015; Yama K. et al., 2015). Однако до сих пор молекулярные механизмы дизрегуляции апоптоза при патологических состояниях, сопровождающихся формированием ОС, в том числе опухолевой прогрессии, до конца не изучены, что и определило актуальность представленного исследования.

Дизрегуляция летальной программы клеток обусловливается изменением соотношения про- и антиапоптогенных белков, возникающим, в частности, в результате последовательной активации редокс-зависимых элементов сигнальной трансдукции различными факторами как внутри-, так и внеклеточного происхождения (Рязанцева Н.В. и др., 2009; Boland M.L. et al., 2013; Dayal R. et al., 2014). Именно межбелковые взаимодействия играют важную роль в сборке и функционировании ферментных комплексов, осуществляющих внутриклеточный метаболизм. В основе функционирования регуляторных, эффекторных, структурных и транспортных молекул полипептидной природы при действии эндогенных и экзогенных лигандов может лежать изменение их конформации, что приводит к дизрегуляции внутриклеточных процессов, в том числе апоптоза. Белковые молекулы представляют собой мишени для регуляции, как внутриклеточной трансдукции сигнала, так и направленности метаболических путей. Причем, белки занимают одну из ведущих позиций в регуляторном процессе, так как, в силу особенностей своего строения, могут располагаться в любом компартменте клетки (Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В., 2008; Allen E.M., Mיעyal J.J., 2012).

Нами было показано увеличение концентрации АФК на фоне изменения состояния тиолдисульфидной системы, что сопровождалось возрастанием числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, приводящим к

развитию гипоэнергетического состояния в опухолевых клетках линии Jurkat. Также нами было установлено, что в опухолевых клетках линии Jurkat в условиях ОС бóльшую часть восстановительного потенциала тиолдисульфидная система использовала для защиты белковых молекул от необратимого окисления, в том числе путем глутатионилирования, что приводило к ингибированию апоптоза опухолевых клеток. Тиоловые группы цистеин-содержащих доменов представляют собой сайт-специфичные последовательности полипептидов для реализации тиоляции/детиоляции с участием глутатиона. Чрезмерная наработка АФК приводила к окислительной модификации рецепторных, структурных, транспортных, каталитических белков, что способствовало накоплению КПБ, окисленного триптофана и битирозина в опухолевых клетках линии Jurkat. Однако избыточное количество окислительно-модифицированных белков в лимфоцитах крови в условиях экспериментального ОС сопровождалось активацией запрограммированной клеточной гибели на фоне дисбаланса тиолдисульфидной системы (увеличение концентрации GSH, GSSG, активности ГПО и ТРР, снижение содержания SH-групп протеинов) (рисунок 12). Но, при установленной нами активации ОМБ в опухолевых клетках линии Jurkat этого эффекта не зафиксировано (рисунок 13). Разнонаправленные изменения реализации запрограммированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat (ингибирование апоптоза) и лимфоцитов крови в условиях экспериментального ОС (активация апоптоза) требовали выявления редокс-зависимых молекулярных механизмов дизрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии.

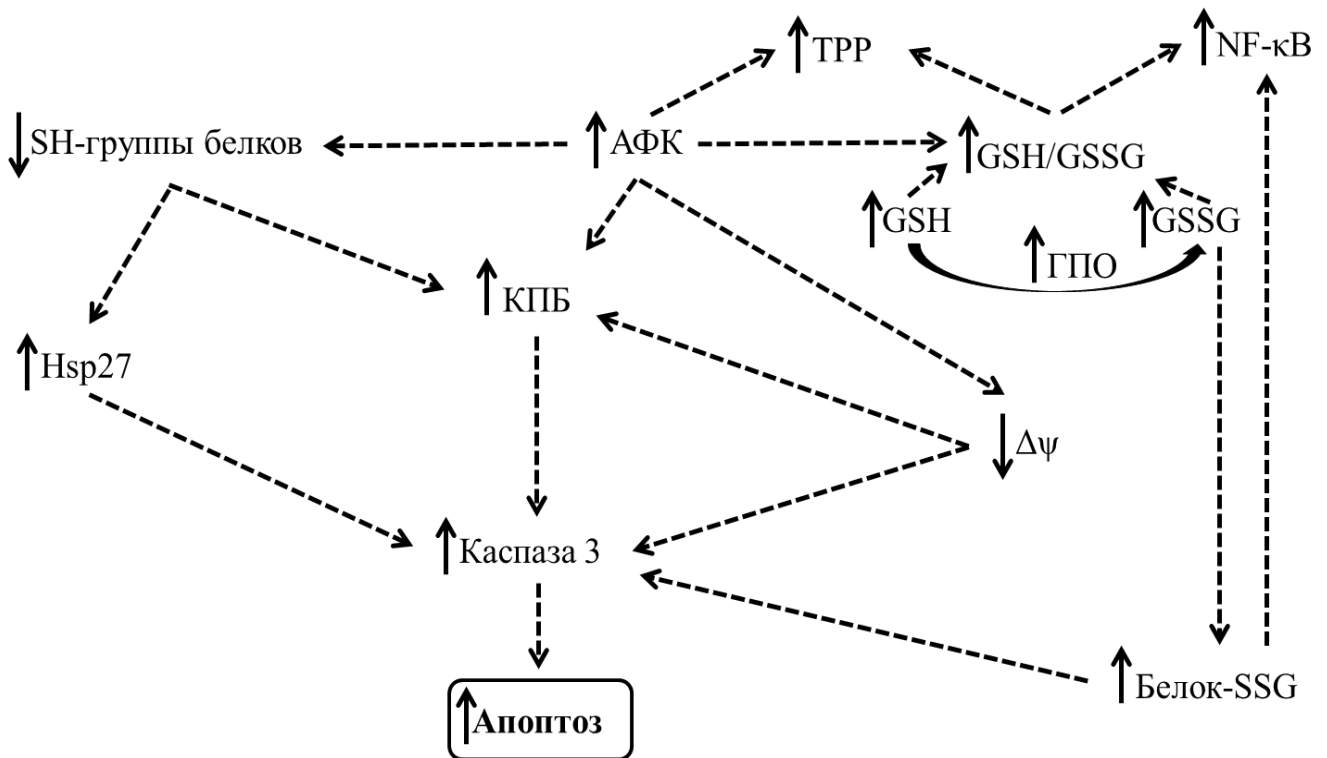


Рисунок 12 – Причинно-следственные связи регуляции апоптоза в лимфоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* (по результатам собственных исследований)

Эффективным способом поддержания адекватной функциональной способности белков является рефолдинг при помощи шаперонов. В проведенном исследовании нами была установлена гиперпродукция как Hsp27 и Hsp70, так и убиквитина в опухолевых клетках линии Jurkat, что косвенно указывало, с одной стороны, на активное восстановление конформации протеинов, а, с другой – на несостоятельность этого процесса и активацию протеолитической деградации модифицированных молекул. Установленный факт, вероятнее всего, является одним из механизмов ингибирования апоптоза.

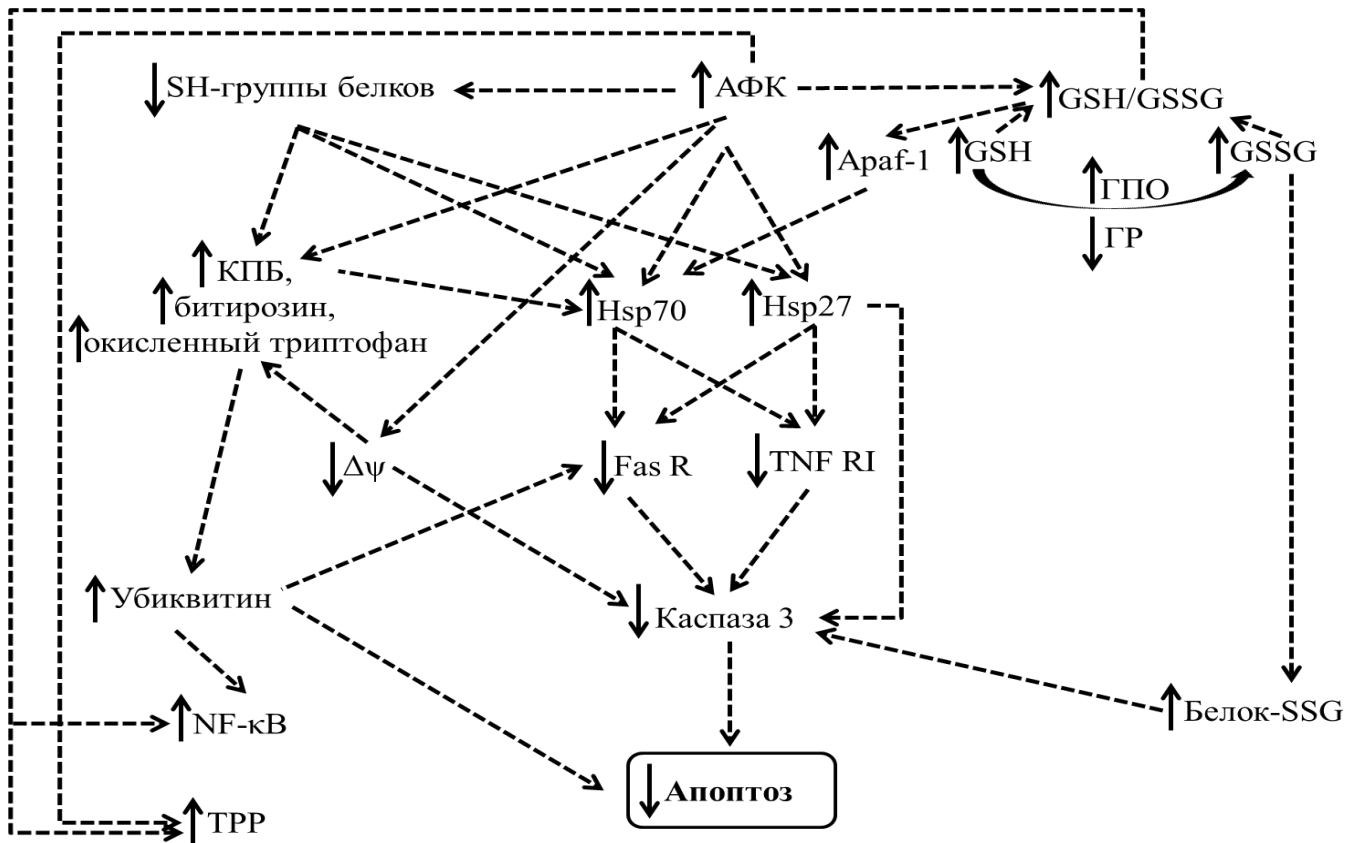


Рисунок 13 – Причинно-следственные связи регуляции апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat (по результатам собственных исследований)

Белки теплового шока 27, 70 и убиквитин вносят существенный вклад не только в регулирование редокс-баланса, но и являются факторами «ускользания» опухолевых клеток линии Jurkat от запрограммированной клеточной гибели, способствуя поддержанию их жизнедеятельности и оптимальному функционированию в условиях ОС. Кроме этого, Hsp тесно ассоциированы с фазами клеточного цикла. Известно, что Hsp70 индуцируется при переходе клетки из фазы G₁ в S-фазу клеточного цикла (Lianos G.D., 2015).

В опухолевой клетке активация протеолиза позволяла элиминировать поврежденные молекулы белков путем расщепления их до аминокислот, которые затем вновь могли использоваться клеткой в процессах биосинтеза полипептидов. Одним из механизмов удаления поврежденных белков является убиквитин-зависимая деградация протеинов. Помимо этого, присоединение убиквитина к белку в

некоторых случаях клеткой воспринимается как часть механизма сигнальной трансдукции и обеспечивает изменение конформации протеина или его внутриклеточную локализацию.

В проведенном исследовании при помощи ингибиторного анализа нами была выявлена роль компонентов тиолдисульфидной системы в редокс-регуляции экспрессии TNF RI и Fas-рецепторов, изменения содержания факторов транскрипции Araf-1 и NF-κB, активности каспазы-3 и количества аннексин-положительных опухолевых клеток линии Jurkat, что указывает на включение SH-групп протеинов и пептидов (глутатиона, тиоредоксина) в процесс сигнальной трансдукции клеток и их влияние на реализацию апоптоза. Смещение редокс-статуса опухолевых клеток линии Jurkat в сторону восстановленности вызывало активацию апоптоза, что достигалось преимущественно путем вовлечения сульфгидрильных групп протеинов в процесс глутатионилирования белков-регуляторов и белков-эффекторов программированной гибели, а при смещении редокс-статуса в сторону окисления – путем накопления необратимых карбонильных производных протеинов, которые являлись триггерными молекулами для запуска их протеолитической деградации.

Таким образом, в процессе выполнения работы нами были установлены молекулярные механизмы участия тиолдисульфидной системы, окислительно-модифицированных протеинов и убиквитин-зависимой деградации белков в дизрегуляции программированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat и выявлены потенциальные мишени селективного редокс-управления апоптозом при опухолевой прогрессии (рисунок 14). Поскольку белки в своей совокупности не только определяют функциональные возможности отдельной клетки, но и представляют собой молекулярные мишени для фармакологической коррекции, селективное управление глутатионилированием или убиквитинилированием белков-регуляторов и белков-эффекторов апоптоза представляется весьма перспективным для разработки персонализированных подходов к терапии злокачественных опухолей.

Полученные нами данные указывают на то, что молекулярными мишенями для таргетного воздействия на программированную гибель опухолевых клеток линии Jurkat могут выступать компоненты тиолдисульфидной системы (GSH, GSSG, ГР, ТРР), регуляция ОМБ и их убиквитин-зависимой деградации. Результаты проведенного исследования могут стать основой для разработки технологии управления апоптозом при опухолевой прогрессии.

Поиск подходов к коррекции дизрегуляции апоптоза и индуцированных ОС нарушений функций клеток открывает широкие перспективы для молекулярных технологий в медицинской практике. Это позволит повысить эффективность существующих методов патогенетической терапии большого числа социально-значимых заболеваний, сопровождающихся дизрегуляцией апоптоза на фоне развития ОС. В связи с этим, управление процессами глутатионилирования и убиквитинилирования протеинов можно рассматривать как потенциальную молекулярную мишень устранения дизрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии.

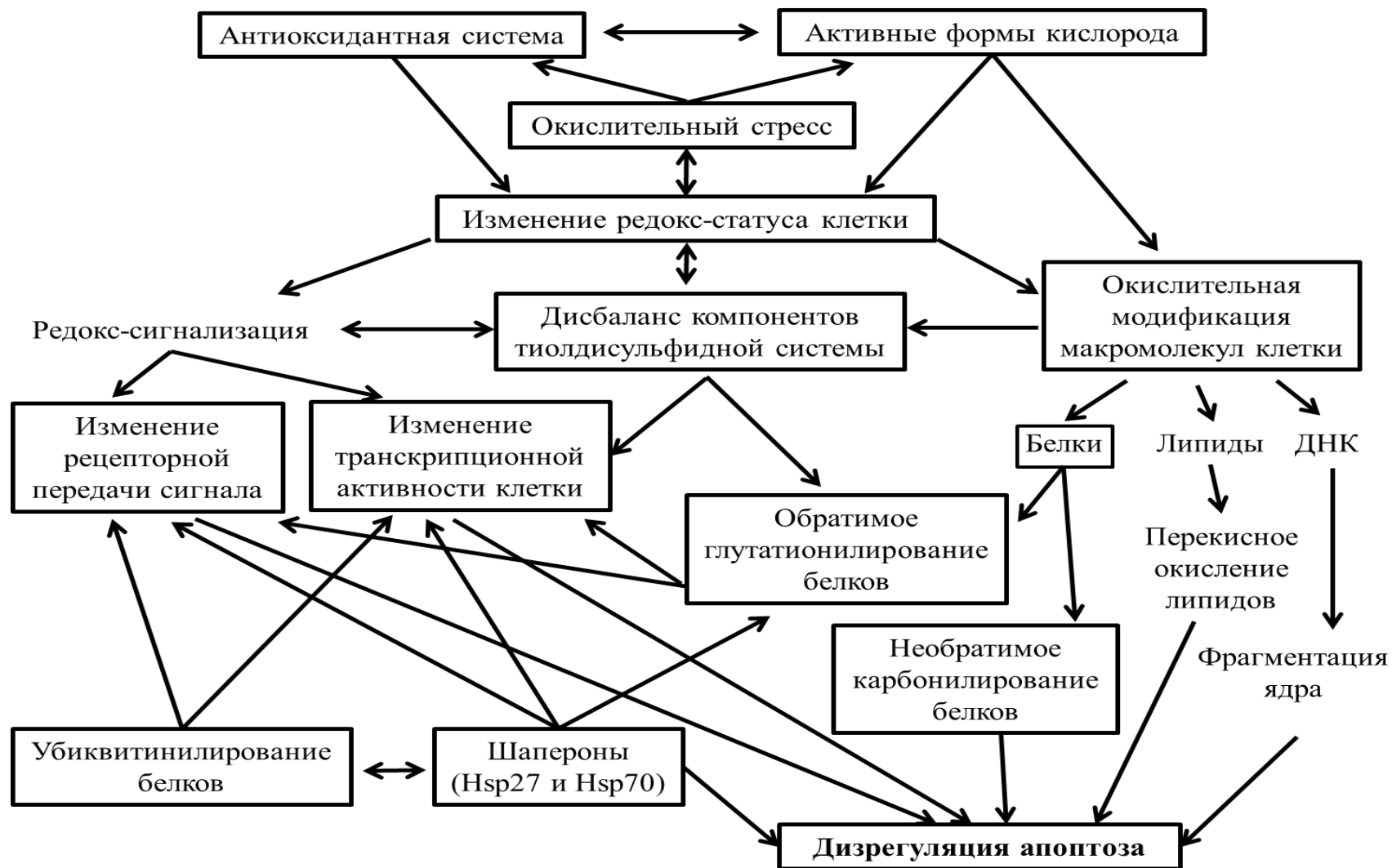


Рисунок 14. Молекулярные механизмы участия компонентов тиолдисульфидной системы, окислительной модификации белков и убиквитин-зависимой деградации протеинов в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat (по данным (Е.Б. Меньщиковой и др., 2008; Е.Е. Дубининой, В.А. Дадали, 2010; А.М. Pisoschi, А. Pop, 2015) и результатам собственных исследований – выделено в рамки)

ВЫВОДЫ

1. Редокс-зависимая дисрегуляция апоптоза в интактных опухолевых клетках линии Jurkat сопряжена с дисбалансом тиолдисульфидной системы, активацией обратимой (увеличение содержания белково-связанного глутатиона) и необратимой (увеличение концентрации карбонильных производных протеинов, битирозина, окисленного триптофана) окислительной модификации белков, убиквитин-зависимого пути деградации протеинов и возрастанием концентрации белков теплового шока 27 и 70.

2. В условиях экспериментального окислительного стресса (0,5 мМ H₂O₂) активация запрограммированной гибели лимфоцитов крови опосредована изменением редокс-статуса тиолдисульфидной системы, возрастанием уровня окислительной модификации белков (увеличение содержания белково-связанного глутатиона и карбонильных производных протеинов) и содержания белка теплового шока 27.

3. Активация рецепторного пути апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat в условиях внутриклеточного редокс-модулирования сопряжена: при блокировании SH-групп пептидов и белков (N-этилмалеимид) с возрастанием уровня карбонильных производных протеинов; при ингибировании синтеза глутатиона *de novo* (бутионин-сульфоксимин) – с увеличением содержания карбонильных производных протеинов и снижением концентрации белково-связанного глутатиона; при восстановлении SH-групп пептидов и белков (1,4-дитиоэритритол) – со снижением концентрации карбонильных производных протеинов.

4. Проапоптотический эффект (активация рецепторного и митохондриального путей) внутриклеточного редокс-модулирования (N-этилмалеимид, бутионин-сульфоксимин, 1,4-дитиоэритритол) в опухолевых клетках линии Jurkat опосредован участием компонентов тиолдисульфидной системы (восстановленный, окисленный и белково-связанный глутатион) в регуляции уровня окислительно-модифицированных протеинов.

5. Активация рецепторного и митохондриального путей апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat при изменении редокс-статуса (N-этилмалеимид, бутионин-сульфоксимин, 1,4-дитиоэритритол) сопряжена со снижением содержания убиквитина.

6. Проапоптотический эффект ингибитора белка теплового шока 27 (5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол) преимущественно реализовывался за счет активации рецепторного пути апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat. Индукция запрограммированной гибели опухолевых клеток опосредована снижением редокс-статуса тиолдисульфидной системы (увеличение содержания окисленного глутатиона, снижение активности тиоредоксинредуктазы), активацией окислительной модификации белков (увеличение концентрации карбонильных производных протеинов и снижение содержания белково-связанного глутатиона) и убиквитин-зависимой деградации (увеличение содержания убиквитина и снижение концентрации убиквитинлигазы).

7. Возрастание уровня карбонильных производных протеинов, уменьшение концентрации белково-связанного глутатиона и убиквитина в опухолевых клетках линии Jurkat связано со снижением содержания белков теплового шока 27, 70.

8. Молекулярными механизмами активации рецепторного и митохондриального путей апоптоза в условиях модуляции редокс-статуса в опухолевых клетках линии Jurkat являются глутатионилирование и убиквитинилирование белков при участии компонентов тиолдисульфидной системы и белков теплового шока 27, 70.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. Уровень продукции гидроксильного радикала в опухолевых клетках линии Jurkat в условиях применения индуктора апоптоза / **О.Л. Носарева**, Е.В. Коновалова, О.Н. Веснина, Д.С. Орлов, И.И. Федосенко, А.И. Наумова // Материалы VII научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Завадские чтения». – Ростов-на-Дону, 24 марта 2012 г. – Ростов-на-Дону : ГБОУ ВПО РостГМУ, 2012. – С. 111.

2. Внутриклеточный уровень продукции ОН-радикала в опухолевых клетках в присутствии ингибитора белка теплового шока 27 / **О.Л. Носарева**, Е.В. Коновалова, О.Н. Веснина, Д.С. Орлов, И.И. Федосенко, А.И. Наумова // Международный журнал экспериментального образования. – 2012. – № 7. – С. 84.

3. Action inhibitor protein heat shock 27 on the activity of glutathione peroxidase and catalase in tumor cells / **O.L. Nosareva**, E.A. Stepovaya, N.V. Ryazantseva, E.V. Konovalova, O.N. Vesnina, D.S. Orlov, I.I. Fedosenko, A.I. Naumova // European Journal of Natural History. – 2012. – № 5. – P. 8.

4. Содержание гидроксильного радикала и фракций глутатиона в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови / Д.С. Орлов, **О.Л. Носарева**, Е.В. Коновалова, О.Н. Веснина, И.И. Федосенко, А.И. Наумова // Современные наукоемкие технологии. – 2012. – № 7. – С. 58-59.

5. Оценка экспрессии генов белков теплового шока в клетках крови при Т-лимфобластном лейкозе и моноцитарной лейкемии / Е.В. Кайгородова, Л.А. Ташириева, Л.С. Литвинова, **О.Л. Носарева**, Е.В. Коновалова // Медицинский академический журнал (приложение). – 2012. – С. 413-415.

6. Оксид азота и сульфид водорода как р38-зависимые регуляторы экспрессии генов *XIAP* и *AVEN* в опухолевых клетках линии Jurkat / Л.А. Таширева, Е.Г. Старикова, В.В. Новицкий, О.А. Васильева, В.Д. Якушина, Е.А. Степовая, Е.В. Бельдягина, А.П. Зима, Т.С. Прохоренко, И.А. Осихов, Т.В. Саприна, **О.Л. Носарева**, Е.В. Коновалова, Е.В. Кайгородова, Н.В. Рязанцева // **Сибирский онкологический журнал**. – 2012. – № 5 (53). – С. 23-27.

7. The inhibition of Hsp27 chaperone affects the level of p53 protein in tumor cells / E.V. Kaigorodova, L.S. Litvinova, E.V. Konovalova, M.V. Klimova, L.A. Tashireva, **O.L. Nosareva**, V.V. Novitskiy // International Journal of Biology. – 2013. – Vol. 5, № 3. – P. 13-18.

8. Состояние системы глутатиона при Т-лимфобластном лейкозе / А.И. Наумова, **О.Л. Носарева**, Е.В. Коновалова, О.Н. Веснина // Сборник трудов XIX межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» / под ред. Т.Д. Власова, В.И. Николаева. – Санкт-Петербург, 10-11 апреля 2013 г. – Санкт-Петербург : Издательство СПбГМУ, 2013. – С. 88-90.

9. The involvement of glutathione system in the regulation of the functional activity of Na^+/K^+ -ATPase proteins in oxidative stress / N.V. Ryazantseva, Ye.A. Stepovaya, **O.L. Nosareva**, Ye.V. Konovalova, A.I. Naumova, Ye.V. Shakhristova, D.S. Orlov, V.V. Novitsky // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 62.

10. Моделирование окислительного стресса в лимфоцитах крови *in vitro* для изучения апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat / Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, Е.В. Коновалова, **О.Л. Носарева**, А.И. Наумова, Д.С. Орлов, О.Н. Веснина, В.В. Новицкий // *Казанский медицинский журнал*. – 2013. – Т. XCIV, № 5. – С. 736-740.

11. Состояние системы глутатиона и реализация апоптоза в лимфоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* / **О.Л. Носарева**, Е.В. Коновалова, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева // *Материалы научно-практической конференции с международным участием, посвященной памяти профессора Е.Ф. Ларина «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных функций в норме и при патологии»*. – Томск, 19-20 ноября 2013 г. – Томск : СибГМУ, 2013. – С. 87-88.

12. Свободнорадикальное окисление белков и липидов в адипоцитах в условиях окислительного стресса / Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая, В.В. Иванов, **О.Л. Носарева**, А.Н. Дзюман, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // *Молекулярная медицина*. – 2014. – № 1. – С. 59-64.

13. Уровень экспрессии убиквитина в опухолевых клетках линии Jurkat / **О.Л. Носарева**, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева, Е.В. Закирова, О.Н. Веснина, А.И. Наумова, Е.В. Шахристова, В.В. Иванов // *Proceedings of the 2nd European Conference on Biology and Medical Sciences*. – Austria, Vienna, 15 August 2014. – «East West» Association for Advanced Studies and Higher Education GmbH, Vienna, 2014. – P. 200-203.

14. Окислительный стресс: влияние на секрецию инсулина, рецепцию гормона адипоцитами и липолиз в жировой ткани / В.В. Иванов, Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая, **О.Л. Носарева**, Т.С. Федорова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 32-39.

15. Окислительная модификация белков и система глутатиона в адипоцитах при сахарном диабете / Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая, В.В. Иванов, **О.Л. Носарева**, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 84-90.

16. Роль белка теплового шока 27 в регуляции системы глутатиона и апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови / Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, **О.Л. Носарева**, Е.В. Коновалова, Д.С. Орлов, А.И. Наумова, С.А. Диденко, О.Н. Веснина, Е.В. Шахристова, А.П. Зима, В.В. Новицкий // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2014. – Т. 158, № 9. – С. 366-369.

17. Система глутатиона участвует в регуляции апоптоза опухолевых клеток / Н.В. Рязанцева, **О.Л. Носарева**, Е.А. Степовая, Е.В. Закирова, А.И. Наумова, О.Н. Веснина, Е.В. Шахристова, Д.С. Орлов, В.Д. Якушина, В.В. Новицкий // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2014. – Т. 13, № 5. – С. 73-78.

18. Влияние инсулина, системы глутатиона и супероксидного анион-радикала на модуляцию липолиза в адипоцитах крыс с экспериментальным диабетом /

В.В. Иванов, Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая, **О.Л. Носарева**, Т.С. Федорова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // **Биохимия**. – 2015. – Т. 80, вып. 1. – С. 111-122.

19. **Носарева, О.Л.** Оксидативный статус опухолевых клеток линии Jurkat при действии блокатора SH-групп белков и индуктора апоптоза / **О.Л. Носарева**, Е.А. Степовая, Е.В. Шахристова // Сборник статей Международной научно-практической конференции «Современная наука : теоретический и практический взгляд». – Уфа, 28 марта 2015 г. – Уфа : РИО МЦИИ ОМЕГА САЙНС, 2015. – С. 13-15.

20. Нарушения экспрессии мРНК Hsp27 и убиквитина как механизм ускользания опухолевых клеток линии Jurkat от апоптоза / **О.Л. Носарева**, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева, Е.В. Закирова, И.О. Мазунин, Л.С. Литвинова, Н.А. Сохоневич, О.Н. Веснина, Е.В. Шахристова // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 66-72.

21. Состояние системы глутатиона и транскрипционная активность NF- κ B в опухолевых клетках линии Jurkat / **О.Л. Носарева**, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева, О.Н. Веснина, Е.В. Закирова, Е.В. Шахристова // Материалы VI Международной научной конференции «SCIENCE4HEALTH 2015. Клинические и теоретические аспекты современной медицины». – Москва, 14-18 апреля 2015 г. – Москва : РУДН, 2015. – С. 185.

22. Участие Hsp27 в поддержании функциональной активности Hsp70, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в опухолевых клетках линии Jurkat / **О.Л. Носарева**, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева, А.И. Наумова, Е.В. Закирова, О.Н. Веснина, Е.В. Шахристова // Материалы VI Международной научной конференции «SCIENCE4HEALTH 2015. Клинические и теоретические аспекты современной медицины». – Москва, 14-18 апреля 2015 г. – Москва : РУДН, 2015. – С. 189-190.

23. Роль окислительной модификации белков в редокс-зависимой регуляции апоптоза опухолевых клеток / Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева, **О.Л. Носарева**, Е.В. Закирова, А.И. Наумова, О.Н. Веснина, Д.С. Орлов, Е.В. Шахристова, В.В. Иванов, В.В. Новицкий // **Молекулярная медицина**. – 2015. – № 4. – С. 60-64.

24. **Носарева, О.Л.** Компоненты системы глутатиона и активность каспазы-3 в лимфоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* / **О.Л. Носарева**, Е.А. Степовая, Е.В. Шахристова // Сборник статей Международной научно-практической конференции «Достижения и проблемы современной науки». – Уфа, 28 июля 2015 г. – Уфа : РИО МЦИИ ОМЕГА САЙНС, 2015. – Ч. 2. – С. 24-26.

25. Oxidative modification of proteins and caspase-3 potency in blood lymphocytes during oxidative stress *in vitro* / **O.L. Nosareva**, Е.А. Stepovaya, N.V. Ryazantseva, E.V. Shakhristova // *International Research Journal*. – 2015. – № 7-5 (38), Pt. 5. – P. 47-48.

26. Изменение системы глутатиона в клетках опухолевой линии P19 при гипоксии / Д.С. Орлов, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, **О.Л. Носарева**, Е.В. Шахристова, В.В. Иванов // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2015. – Т. 14, № 4. – С. 41-45.

27. Роль редокс-потенциала системы глутатиона в дисрегуляции апоптоза клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 / Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева, **О.Л. Носарева**, В.Д. Якушина, В.В. Иванов,

В.В. Новицкий // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2015. – Т. 160, № 9. – С. 351-354.

28. Роль окислительной модификации белков в редокс-регуляции активности каспазы-3 в лимфоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* / **О.Л. Носарева**, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева, Е.В. Шахристова, О.Н. Веснина, В.В. Новицкий // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2015. – Т. 14, № 6. – С. 61-67.

29. Уровень экспрессии CD95 и CD120 опухолевых клеток линии Jurkat при действии блокатора и протектора SH-групп / **О.Л. Носарева**, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева, Е.В. Шахристова // Сборник трудов XIX Международного Форума по проблемам науки, техники и образования «III тысячелетие – новый мир» / под ред. В.В. Вишневого. – Москва, 22-25 декабрь 2015 г. – Москва : Академия наук о Земле, 2015. – С. 113-114.

30. Окислительная модификация белков и система глутатиона при модуляции редокс-статуса клеток эпителия молочной железы / Е.А. Степовая, Е.В. Шахристова, Н.В. Рязанцева, **О.Л. Носарева**, В.Д. Якушина, А.И. Носова, В.С. Гулая, Е.А. Степанова, Р.И. Чильчигашев, В.В. Новицкий // **Биомедицинская химия.** – 2016. – Т. 62, вып. 1. – С. 64-68.

31. Участие глутатиона и окислительной модификации белков в реализации апоптоза клеток эпителия молочной железы при индуцированном окислительном стрессе / Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева, **О.Л. Носарева**, Р.И. Чильчигашев, В.В. Новицкий // **Сибирский медицинский журнал.** – 2016. – Т. 36, № 2. – С. 19-23.

32. **Носарева, О.Л.** Окислительная модификация белков и аминокислот в опухолевых клетках линии Jurkat при блокировании синтеза глутатиона *de novo* / **О.Л. Носарева**, Е.А. Степовая, Е.В. Шахристова // Материалы XXII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии-2016» / под ред. Власова Т.Д., Николаевой В.И. – Санкт-Петербург, 7-8 апреля 2016 г. – Санкт-Петербург : Издательство, 2016. – С. 70-72.

33. Роль окислительной модификации белков и редокс-статуса в реализации апоптоза опухолевых клеток линии MCF-7 / Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева, **О.Л. Носарева**, В.Д. Якушина, В.В. Иванов, В.В. Новицкий // **Известия Российской академии наук. Серия Биологическая.** – 2016. – № 5. – С. 453-458.

34. **Носарева, О.Л.** Роль компонентов системы глутатиона в функционировании Araf-1 и NF-κB в опухолевых клетках линии Jurkat / **О.Л. Носарева**, Е.А. Степовая, Е.В. Шахристова // Acta Naturae. – 2016. – Т. 2, спецвыпуск. – С. 69-70.

35. Участие белков теплового шока 27 и 70 в редокс-зависимой регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat / **О.Л. Носарева**, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, Е.В. Шахристова, Е.А. Степанова, В.С. Гулая // **Биомедицинская химия.** – 2016. – Т. 62, вып. 6. – С. 670-673.

36. Способ оценки эффективности стимуляции антиоксидантной активности : пат. 2516925 Рос. Федерация : МПК G01N 33/53 / Н.В. Канская, Е.А. Степовая, Н.А. Федорова, **О.Л. Носарева**, И.А. Позднякова, А.В. Канский, С.И. Твердохлебов. – № 2013115145/15 ; заявл. 04.04.2013 ; опублик. 20.05.2014, Бюл. № 14. – 10 с.

37. Способ прогнозирования эффективности защиты лимфоцитов от переоисления : пат. 2525183 Рос. Федерация : МПК G01N 33/48 / Н.В. Канская, Е.А. Степовая, Н.А. Федорова, **О.Л. Носарева**, И.А. Позднякова, А.В. Канский, С.И. Твердохлебов. – № 2013121414/15 ; заявл. 07.05.2013 ; опубл. 10.08.2014, Бюл. № 22. – 13 с.

38. Способ защиты клеток от апоптоза : пат. 2541774 Рос. Федерация : МПК G01N 33/52 / Н.В. Канская, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, **О.Л. Носарева**, И.А. Позднякова, Н.А. Федорова, С.И. Твердохлебов, А.В. Канский. – № 2013121503/15 ; заявл. 07.05.2013 ; опубл. 20.02.2015, Бюл. № 5. – 12 с.

Список использованных сокращений:

АФК – активные формы кислорода,
 белок-SH – SH-группы белков,
 белок-SSG – белково-связанный глутатион,
 ГПО – глутатионпероксидаза,
 ГР – глутатионредуктаза,
 ДТНБ – 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойная) кислота,
 кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота,
 КПБ – карбонильные производные белков,
 мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота,
 НАДФН – никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный,
 ОМБ – окислительная модификация белков,
 ОС – окислительный стресс,
 ТРР – тиоредоксинредуктаза,
 ЭДТА – этилендиаминтетраацетат,
 Араf-1 – apoptotic protease activating factor-1, фактор активации протеаз-1,
 BSO – бутионин-сульфоксимин,
 CD – cluster of differentiation, поверхностный кластер дифференцировки,
 DEX – дексаметазон,
 DTE – 1,4-дитиоэритритол,
 GSH – восстановленный глутатион,
 GSSG – окисленный глутатион,
 Hsp – heat shock proteins, белки теплового шока,
 JC-1 – 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетра-этилбензимидазолилкарбоцианин йодида,
 Jurkat – опухолевые клетки «Т-лимфобластной лейкемии человека»,
 KRIBB3 – 5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол,
 NEM – N-этилмалеимид,
 NF-κB – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, транскрипционный ядерный фактор κB,
 TNF RI – tumor necrosis factor receptor I type, рецептор фактора некроза опухоли I типа,
 Δψ – трансмембранный митохондриальный потенциал.

Считаю своим приятным долгом выразить благодарность за помощь в выполнении работы доктору медицинских наук, профессору кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики Сибирского государственного медицинского университета Татьяне Сергеевне Федоровой; кандидату биологических наук, доценту кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики Сибирского государственного медицинского университета Владимиру Владимировичу Иванову; кандидату медицинских наук, доценту кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики Сибирского государственного медицинского университета Евгении Викторовне Шахристовой.