

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ
И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ»

Н.Ю. Часовских, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий

АПОПТОЗ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС



Томск – 2009

УДК 616-091.818:577.1
ББК Е65+Е902.34
Ч247

В работе приводятся результаты исследований, поддержанных Советом по грантам при Президенте РФ для ведущих научных школ РФ (НШ-4153.2006.7), Российским фондом фундаментальных исследований (№ 07-04-12150, 09-04-99026), а также выполненных в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002–2006 годы» (государственные контракты № 02.442.11.7276, № 02.445.11.7419), ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (государственный контракт № 02.512.11.2285)

Рецензенты:
академик РАН В.А. Труфакин,
академик РАН А.М. Дыгай

Часовских Н.Ю., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В.
Ч247 Апоптоз и окислительный стресс. — Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2009. — 148 с.

ISBN 978-5-94476-172-9

В монографии рассмотрены вопросы взаимосвязи апоптоза и окислительного стресса при остром воспалении. Особое внимание уделено роли редокс-чувствительных сигнальных систем мононуклеарных лейкоцитов крови в реализации запрограммированной гибели при окислительном стрессе. Полученные данные являются основой для разработки молекулярной технологии воздействия на оксидант-опосредованную модуляцию активности ключевых регуляторов апоптоза. Идентифицированные молекулярные мишени могут быть использованы в разработке подходов селективного управления апоптозом клеток при патологических процессах, патогенез которых сопряжен с развитием окислительного стресса.

Табл. 8. Ил. 32. Библиогр.: 471 назв.

УДК 616-091.818:577.1
ББК Е65+Е902.34

ISBN 978-5-94476-172-9

© Часовских Н.Ю., Рязанцева Н.В.,
Новицкий В.В., 2009
© ООО «Печатная мануфактура», макет, 2009

Введение

На современном этапе развития медико-биологической науки накоплен большой объем знаний о механизмах повреждения и адаптации клеточных систем при патологических процессах разного генеза. В центре внимания исследователей находятся ключевые механизмы регуляции апоптоза, который представляет собой активную форму клеточной гибели и является физиологическим механизмом устранения избыточных и (или) функционально аномальных клеток. Известно, что развитие различных болезней (злокачественные новообразования, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, острые и хронические воспалительные процессы, сахарный диабет и др.) связано с нарушениями механизмов реализации апоптоза, приводящими к его излишнему активированию или ингибированию [65, 179]. Наряду с этим важным звеном патогенеза данных заболеваний является дисбаланс окислительного метаболизма [45].

Развитие окислительного стресса при ряде патологий обусловлено резкой интенсификацией процессов свободнорадикального окисления и (или) снижением резерва антиоксидантной защиты, что приводит к значительному накоплению активных форм кислорода (АФК) [99]. Последние вызывают окислительную модификацию белковых и липидных молекул, повреждение ДНК, нарушение структуры мембран и другие процессы [42, 141, 469]. Вместе с тем известно, что АФК являются внутриклеточными мессенджерами, участвующими в регуляции различных клеточных процессов, в частности апоптоза [74, 338].

Влияние АФК на про- и антиапоптотические мишени и механизмы осуществляется непосредственно или через внутриклеточные редокс-зависимые сигналпередающие системы [65]. При этом в клетке может происходить одновременная активация нескольких молекулярных путей, взаимодействующих между собой.

Индущирующие апоптоз сигналы стимулируют множество киназ, включая митогенактивируемые протеинкиназы JNK и p38. Последние воздействуют на белки-мишени, связанные с функционированием факторов транскрипции и регуляцией программированной клеточной

гибели: p53, NF-κB, AP-1 и др. [65, 248]. Под контролем редокс-чувствительных транскрипционных факторов находится синтез белков семейства Bcl-2, являющихся ключевыми регуляторами апоптоза. В частности, p53 активирует экспрессию Bid, PUMA и Noxa [173, 353], NF-κB управляет генами, кодирующими белки Bcl-X_L, IAP, A1, ответственные за угнетение процесса апоптоза [448]. Вместе с тем ряд исследований свидетельствуют о проявлениях редокс-чувствительными элементами сигнальной трансдукции как про-, так и антиапоптотической активности [266, 376], зависящей от особенностей индуцирующих сигналов, комбинаций возможных путей их передачи и типа клеток.

Данное обстоятельство затрудняет возможность идентификации механизмов развития заболеваний, сопровождающихся развитием окислительного стресса и сопряженных с дисрегуляцией летальной программы клеток. Необходимость разработки и внедрения селективных технологий управления апоптозом ставит перед фундаментальной наукой задачу идентификации редокс-чувствительных молекулярных мишеней и обосновывает целесообразность проведения комплексного исследования механизмов нарушения запрограммированной гибели клеток в условиях окислительного стресса.

В настоящей монографии рассмотрены современные представления о взаимоотношении окислительного стресса и апоптоза, а также результаты исследования редокс-чувствительных молекулярных механизмов реализации запрограммированной гибели клеток, выполненного на кафедрах фундаментальных основ клинической медицины, патофизиологии и в лаборатории молекулярной медицины Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск).

Представленные фактические данные были получены в результате реализации комплексных проектов, выполненных в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002–2006 гг.», ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 гг.», а также поддержанных Российским фондом фундаментальных исследований. Полученные знания могут послужить основой для обоснования молекулярной технологии воздействия на оксидантопосредованную модуляцию активности ключевых регуляторов апоптоза. Идентифицированные в ходе исследования редокс-чувствительные молекулярные мишени могут быть использованы в разработке подходов селективного управления апоптозом клеток при патологических процессах, патогенез которых сопряжен с развитием окислительного стресса, а также с нарушением реализации летальной программы клеток.

Глава 1

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ВЗАИМОСВЯЗИ АПОПТОЗА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

1.1. Окислительная регуляция и дисрегуляция клеток

Исследование механизмов окислительного стресса является одной из актуальных медико-биологических проблем благодаря его ведущей роли в этиологии старения и патогенезе ряда заболеваний. Дисбаланс окислительного метаболизма выступает в качестве важнейшего патогенетического звена развития воспалительного процесса, радиационных поражений, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, экзогенных и эндогенных интоксикаций. Несмотря на разнообразие причин, механизмы нарушения окислительного гомеостаза носят общий характер при многих патологических состояниях, а некоторые отличительные особенности выявляются лишь на начальных его стадиях. Так, интенсификация свободнорадикальных процессов при воспалении обуславливается «дыхательным взрывом», при гипоксии – нарушением системы тканевого дыхания, при химических поражениях – активацией системы микросомального окисления [42]. Окислительный стресс представляет собой нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса в пользу прооксидантных факторов, которые могут вызывать потенциальные повреждения [15, 99].

В роли данных факторов выступают активные формы кислорода, обладающие высокой реакционной способностью, вызывая, в частности, окислительную модификацию биополимеров – белков, липидов, нуклеиновых кислот и углеводов [42, 141]. В физиологических условиях их токсическое действие предотвращается за счет функционирования антиоксидантной системы (АОС), которая представлена ферментативными (супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза, фосфолипид-гидропероксид-глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, глутатионредуктаза) и неферментативными (глутатион, хелаторы железа, витамины С и Е и др.) компонентами [21, 42, 141, 142, 263]. Нарушение соотношения ферментативных компонентов антиоксидантной системы может приводить к дополнительной генерации АФК и служить одним из проявлений окислительного стресса [42, 45, 46, 65, 141].

В результате окислительно-восстановительных реакций в организме постоянно происходит генерация активированных кислородных метаболитов: O_2 , O^{\cdot} , H_2O_2 , HO^{\cdot} , $OS_{1\sim}$, RO_2 и др. Часть из них являются свободными радикалами и имеют неспаренный электрон. Помимо данных соединений в клетках присутствуют связанные радикалы (например, компоненты цепи транспорта электронов в митохондриях). Их свободное взаимодействие с другими молекулами ограничивается локализацией в соответствующих клеточных структурах. Другие кислородсодержащие молекулы (перекись водорода, синглетный кислород, гипогалоиды и т.д.) не являются радикалами, хотя и взаимодействуют с органическими молекулами через радикальные механизмы. Данные соединения включаются с радикалами в одну группу, объединяющую ферментативные продукты активации кислорода – активные формы кислорода [31, 46].

Источниками АФК в организме служат радикальные окислительные реакции и металлопротеиновые ферментативные системы. В обоих случаях молекулярный кислород выступает акцептором электронов, АФК появляются в результате неполного восстановления молекулы O_2 [3, 45]. Показано, что в условиях окислительного стресса в роли прооксидантов могут выступать некоторые антиоксиданты [50, 304]. Усиление окислительного стресса индуцируется происходящей при гипоксии активацией гликолиза. При этом возникают условия для нарастания содержания «активных форм» металлов переменной валентности, участвующих в реакциях, связанных с генерацией радикальных продуктов. Так, в присутствии Fe/Cu и O_2 тиолы (RSH) являются источниками радикалов RS^{\cdot} , $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и OH^{\cdot} , никотинамидадениндинуклеотидфосфат-Н (НАДФ-Н)-радикалов НАДФ $^{\cdot}$, аскорбиновая кислота – семидегидраскорбат радикала [44, 65].

По мнению Ю.А. Владимирова [22], существуют три категории АФК: первичные, вторичные и третичные. Первичные АФК образуются при окислении некоторых молекул и обладают регуляторным или умеренным антимикробным действием. Так, оксид азота NO обладает сосудорасширяющим действием, супероксид OH^- может превращаться в перекись водорода H_2O_2 и в дальнейшем – в гипохлорид ClO^- при помощи специализированного фермента супероксиддисмутазы. Данные соединения используются макрофагами для защиты организма от бактериальных инфектов. Избыток супероксида при его неэффективной нейтрализации взаимодействует с NO , образуя пероксинитрит или переводя трехвалентное железо в двухвалентное. Последнее при взаимодействии с H_2O_2 , $HClO$ и липоперекисями образует гидроксильный радикал OH^{\cdot} или липоксильный радикал LO^{\cdot} . Данные ра-

дикалы наряду с пероксинитритом являются вторичными. Они обладают сильным токсическим действием за счет необратимого повреждения мембранных липидов, молекул ДНК, углеводов и белков. Соединение вторичных радикалов с молекулами антиоксидантов и других легкоокисляющихся соединений приводит к образованию различных по своему действию третичных радикалов.

Несмотря на разнообразие причин, вызывающих интенсификацию свободнорадикальных реакций при различных патологических процессах и состояниях, возникающие на молекулярном и клеточном уровне изменения однотипны (рис. 1) [42].



Рис. 1. Окислительный стресс как патогенетическое звено при заболеваниях разного генеза (по данным Е.Е. Дубининой, 2001)

Важнейшим эффектом окислительной цитотоксической атаки АФК является индукция процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах [22, 114], повреждение мембраносвязанных белков, инактивация ферментов, а также повреждение ДНК клеток [33, 46, 184].

Воздействию АФК в первую очередь подвергаются SH-содержащие группы белков. Повреждение Ca^{2+} -АТФ-азы вызывает нарушение транспорта ионов кальция через мембрану. Окисление SH-групп ксантиндегидрогеназы в нейронах сопровождается ее превращением в ксантиноксидазу. При этом меняется характер катализируемой данным ферментом реакции: помимо превращения ксантина в мочевую кислоту, связывающую свободнорадикальные формы кислорода, начинается образовываться супероксид-анион кислорода. Таким образом, в клетках возрастает концентрация свободных радикалов [15].

Окислительная модификация липидных молекул вызывает повреждение мембран, нарушение их ионной проницаемости, изменение функционального статуса клетки. Так, в случае эритроцитарных мембран происходит усиление гемолиза красных клеток крови и изменяются их реологические свойства [40, 72, 304]. Окисление липопротеинов низкой плотности в плазме крови делает их цитотоксичными и легко захватываемыми макрофагами [65, 75]. Повреждение нуклеиновых кислот при окислительном стрессе в наибольшей степени затрагивает ДНК митохондрий, что обусловливается недостаточной активностью систем репарации и низким содержанием защитных гистоновых белков [334, 425].

В физиологически допустимых концентрациях АФК выступают в качестве вторичных посредников, эффект которых обусловлен лиганд-рецепторными взаимодействиями. В роли таких лигандов могут выступать гормоны (инсулин, ангиотензин, паратиреоидный гормон, витамин D_3), цитокины, а также факторы роста. Образование лиганд-рецепторных комплексов сопровождается наработкой АФК, которые активно включаются в сигнальную трансдукцию, влияя на ключевые звенья метаболических процессов в клетке (фосфорилирование, метаболизм кальция, гидролиз фосфолипидов, модуляция факторов транскрипции) [65].

Среди физиологических эффектов АФК — регуляция клеточной пролиферации и тонуса сосудов [184, 290], индукция транскрипции определенных генов [287, 304]. В частности, АФК непосредственно участвуют в активации онкогенов *c-fos*, *c-myc* [155, 304, 433] и *c-jun*, кодирующего фактора транскрипции AP-1 в ответ на действие ионизирующей радиации [421]. O_2^- и H_2O_2 активируют фактор транскрип-

ции Nucleus factor kappa B (NF-κB), который вызывает экспрессию генов, кодирующих ряд цитокинов и вирусов [38, 263]. Свободный радикал NO[•] подавляет активацию NF-κB, увеличивая продукцию ингибитора фактора транскрипции IκB и стабилизируя его [112, 143]. Активация фосфорилирования тирозина и ингибирование дефосфорилирования активными формами кислорода ведет к активации тирозинкиназ и стимуляции НАДФН-оксидазы нейтрофилов [238]. В нейронах АФК выполняют важные регуляторные функции: супероксид-анион кислорода участвует в процессе синтеза простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов и арахидоновой кислоты, высвобождающейся из мембранных фосфолипидов в процессе ПОЛ [15].

Благодаря наработке перекиси водорода и супероксид-радикала фагоцитарные клетки осуществляют свою микробицидную функцию [63, 65]. Кислородные радикалы широко вовлечены в процессы неспецифической резистентности организма и иммунорегуляции [61, 239, 416]. Установлено, что все антитела, независимо от их специфичности и происхождения, способны активировать кислород и продуцировать перекись водорода [247]. Если в покое 10–15% всего потребляемого кислорода подвергается одноэлектронному восстановлению [242], то в условиях стресса (при возрастании активности супероксидгенерирующих ферментов) интенсивность его восстановления возрастает еще на 20% [460]. Таким образом, АФК играют весьма важную регуляторную роль в нормальной жизнедеятельности организма.

На продукцию АФК клетками влияют факторы, регулирующие их физиологическую активность, в том числе гормоны и цитокины. При этом реакция ткани складывается из индивидуальных реакций составляющих ее различных клеток. В частности, факторы, влияющие на активность НАДФН-оксидазы хондроцитов [319], стимулируют перестройки хрящевой и костной тканей [340]. Активность НАДФН-оксидазы фибробластов повышается при их механическом раздражении [131]. Показано, что на скорость продукции оксидантов стенкой сосудов влияют интенсивность и характер тока по ним крови [360]. Вместе с тем АФК и сами могут имитировать действие многих гормонов и нейромедиаторов. Так, H₂O₂ в низких концентрациях имитирует действие инсулина на адипоциты, стимулирующего в них активность НАДФН-оксидазы [327]. Кроме того, H₂O₂ подавляет действие адреналина (антагониста действия инсулина), ингибирующего НАДФН-оксидазу жировых клеток [318]. Существенно, что генерация клетками O²⁻ и других АФК предшествует остальным событиям во внутриклеточной сигнальной цепи [306].

Среди АФК, образующихся при окислительном стрессе, важную роль в функционировании многочисленных систем организма играет H_2O_2 . Перекись водорода относится к окислителям средней силы, при этом она взаимодействует с веществами как радикальным, так и нерадикальным путем. В водных растворах в отсутствие каталазы, пероксидаз и ионов металлов переменной валентности H_2O_2 относительно стабильна. Являясь электростатически нейтральной молекулой, она легко проникает сквозь гидрофобные мембраны и может мигрировать в клетки и ткани [53]. Наличие нейтральных аддуктов H_2O_2 (например, гистидина) обеспечивает ее проникновение внутрь клеток даже в присутствии каталазы [29].

Источником H_2O_2 служат ферментативные реакции с оксидазами, переносящими два электрона на молекулу кислорода (ксантинооксидазой, оксидазами L-аминокислот), а также реакция дисмутации, катализируемая супероксиддисмутазой [42]. Около 80% H_2O_2 , генерируемой фагоцитами в очаге воспаления, образуется в реакции дисмутации O_2 супероксиддисмутазой [77].

В миллимолярных концентрациях перекись водорода обладает цитотоксическим действием и вызывает гибель клеток в культуре фибробластов [343] и гладкомышечных клеток [53]. Показано, что H_2O_2 вызывает гибель опухолевых клеток [119], эндотелиоцитов [175], натуральных киллеров (NK) и T-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных людей посредством апоптоза [44]. Выраженность данного эффекта перекиси водорода зависит от клеточной популяции: наиболее устойчивыми к действию H_2O_2 являются Th-лимфоциты [53]. Однако при иммунодефицитных состояниях (например, ВИЧ-инфекция) уязвимость Th-лимфоцитов к действию H_2O_2 , напротив, повышается. Так, при концентрации H_2O_2 более 10 мкмоль рост клеточной культуры замедляется по причине недостаточности антиоксидантных систем [44].

По данным G. Murrell и F.N. Bromley [343], перекись водорода в концентрации 10^{-6} моль усиливает, а в концентрации 10^{-3} моль — ингибирует пролиферацию фибробластов в культуре. Окислительный стресс, инициированный добавлением H_2O_2 в концентрации 1–2 ммоль к взвеси клеток эпидермальной карциномы человека A431, активирует транскрипционные факторы STAT3 и STAT1 [18]. Данный процесс зависит от активности тирозинкиназы рецептора EGF. Максимальный уровень фосфорилирования EGF выявляется через 2 мин после воздействия H_2O_2 [18]. Показано, что перекись водорода играет важную роль в индукции синтеза белков теплового шока, повышающих резистентность клеток к высоким температурам, радиации, токсическому действию ионов тяжелых металлов и лекарственных препаратов [35, 168].

Механизмы цитотоксического действия перекиси водорода довольно разнообразны. Так, *in vitro* в концентрациях 0,1–2,5 ммоль H_2O_2 вызывает одонитевые разрывы ДНК, что может служить причиной гибели клеток [11]. Данный механизм цитотоксического действия H_2O_2 сопровождается фрагментацией молекул ДНК, что является важным признаком апоптотической гибели клеток [12, 38].

К другим механизмам воздействия H_2O_2 на клетки относится снижение активности альдегиддегидрогеназы и содержания лактата, уменьшающее интенсивность гликолиза [344], а также индукция процессов ПОЛ, изменяющих структуру и свойства (в том числе проницаемость) клеточных мембран. При этом увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} приводит к активации фосфоинозитидного обмена [11], а истощение запасов АТФ – к гибели клетки [3, 334].

Согласно данным Н.К. Зенкова и соавт. [45], а также Д.Б. Зорова и С.Ю. Банниковой [46], возможна перекисьюиндуцированная инактивация (*in vivo*) одного из ферментов антиоксидантной защиты каталазы и ингибитора протеиназ. Активация перекисью водорода сывороточных белков системы комплемента по альтернативному пути увеличивает содержание хемоаттрактанта C5a [416].

Помимо генерации АФК важную роль в регуляции редокс-процессов в клетке играет антиоксидантная система. Ее ферментативные компоненты включают супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионзависимые пероксидазы и трансферазы. Действие данных ферментов, направленное против определенных АФК, строго специфично для различных типов клеток, органов и используемых металлов-катализаторов (железо, селен, цинк, медь, марганец). Неферментативная антиоксидантная защита клетки включает глутатион, хелаторы железа, витамины С и Е [42].

Ведущую роль в обеспечении антиоксидантной защиты в клетке играют пептиды с SH-содержащими аминокислотами (цистеин, цистин, метионин) и, в частности, глутатион-трипептид, образованный аминокислотами цистеином, глутаминовой кислотой и глицином. В организме человека присутствуют окисленная (GSSG; около 3% от общего количества) и восстановленная (GSH) формы глутатиона, антиоксидантное действие которого обуславливается его функцией как субстрата для глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы [45, 65]. Глутатион выступает донором атомов водорода для H_2O_2 и липидных перекисей. Наряду с другими SH-содержащими белками восстановленный глутатион стабилизирует мембраны и ингибирует действие АФК. Связывание внутриклеточного глутатиона с ионами меди препятствует их участию в реакции Фентона. Глутатионпероксидаза необходима для

восстановления нестойких органических гидропероксидов (в том числе гидропероксидов полиненасыщенных жирных кислот) в стабильные соединения — оксикислоты: $2\text{GSH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$. Все глутатионпероксидазы, подобно каталазе, способны также утилизировать перекись водорода ($2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$) [65, 142].

Глутатионпероксидазная и каталазная ферментативные системы определяют устойчивость клеток к воздействию H_2O_2 , при этом первая эффективно работает при малых концентрациях перекиси, вторая — при высоких [42, 141]. Многоуровневая защита от H_2O_2 обеспечивает устойчивость клеток к ее цитотоксическому эффекту. Большинство клеток устойчивы к концентрациям перекиси водорода менее 50 ммолей. Концентрации H_2O_2 от 0,1 до 50 ммолей могут вызывать различные функциональные изменения в клетках, выступая в качестве важного внутриклеточного мессенджера [29, 363].

Анализируя изложенные выше данные о путях образования и нейтрализации АФК в клетках, можно сделать заключение об их двойственной роли. С одной стороны, АФК являются серьезным повреждающим фактором для клетки, с другой — стимулом к мобилизации ресурсов для клеточной адаптации к неблагоприятным условиям. Низкие концентрации АФК стимулируют защитные системы клетки, а высокие приводят к разрушению клеточных структур и вызывают гибель клетки.

Функционирование живых систем в условиях физиологического оптимума характеризуется про- и антиоксидантным равновесием — важнейшим механизмом поддержания окислительного гомеостаза. Различные экзо- и эндогенные повреждающие агенты вызывают сдвиг равновесия про- и антиоксидантной систем в сторону первой с развитием окислительного стресса [15, 27]. Синтез АФК и окислительные реакции с их участием можно рассматривать как своеобразный внутренний механизм адаптации и эволюции. На воздействие патогенного фактора организм отвечает повышенной продукцией АФК. В результате свободнорадикального окисления синтезируется масса новых соединений, которые могут помочь организму адаптироваться к новым условиям или найти механизмы борьбы с патогенным воздействием [52].

Считается, что окислительный стресс средней интенсивности стимулирует пролиферацию, в то время как высокие концентрации прооксидантов инициируют гибель клеток посредством апоптоза (физиологически достижимые значения концентраций) или некроза (при концентрациях выше апоптогенных значений). Указанные эффекты зависят от чувствительности клеток к окислительному стрессу, обусловленной состоянием антиоксидантной защиты и активностью систем репарации [65].

Особый интерес исследователей в данном аспекте привлекает роль изменений редокс-статуса клетки в модуляции ее запрограммированной гибели. Интенсификация окислительных реакций при различных патологических состояниях может оказывать влияние на процессы реализации апоптоза (как в сторону активации, так и в сторону ингибирования), выступая в качестве дополнительного механизма развития заболевания. Вместе с тем вопросы физиологической и патологической роли изменений окислительного гомеостаза и молекулярные механизмы их влияния на жизнедеятельность или гибель клетки требуют дальнейшего изучения.

1.2. Молекулярные механизмы регуляции апоптоза

Апоптоз представляет собой активную форму клеточной гибели, которая является физиологическим механизмом устранения избыточных и (или) функционально аномальных клеток для поддержания тканевого гомеостаза организма. С его помощью удаляются поврежденные, мутировавшие и закончившие свой жизненный цикл клетки [10, 12, 120]. Помимо этого запрограммированная гибель клеток играет важную роль в обеспечении нормального развития многоклеточного организма в онтогенезе [110].

Согласно современным представлениям о механизмах реализации апоптоза, данный процесс включает в себя несколько этапов [308, 446]. Фаза инициации летальной программы клеток может обуславливаться влиянием гипоксии, гипероксии, химическими и физическими воздействиями, перекрестным связыванием соответствующих рецепторов, удалением факторов роста и так далее. Активация различных запускающих механизмов приводит к реализации единого пути гибели клетки (эффektorная фаза) с последующей ее деградацией (заключительная фаза) [6]. При этом в клетке наблюдаются следующие ультраструктурные изменения: на начальном этапе клетка округляется, ее цитоплазма конденсируется, эндоплазматический ретикулум расширяется с образованием везикул. Последующее уплотнение хроматина и фрагментация ядрышек приводят к разрыву ядерной мембраны и сегментации ядра. На этапе деградационных изменений клетка распадается на кластеры апоптозных телец (мембранных везикул с внутриклеточным содержимым) без индукции воспаления. Апоптотическая гибель клеток завершается их фагоцитозом макрофагами, эпителиоцитами и в меньшей степени – клетками микроокружения [76]. Погибающие путем апоптоза клетки не выделяют продукты гибели в окружающую среду, фагоцитируются,

в связи с чем воспаления (характерного для некроза) не происходит [52].

При некрозе, напротив, наблюдается разрыв плазматической и внутриклеточных мембран, разрушение органелл, высвобождение лизосомальных ферментов и выход цитоплазматического содержимого в межклеточное пространство [97].

Нарушение многоуровневой регуляции программированной гибели клеток может возникнуть на различных этапах реализации летальной программы клетки (на уровне рецепторов, каспаз, про- и антиапоптогенных белков) и приводить к возникновению дисрегуляционной патологии апоптоза. Вышедший из-под контроля апоптоз становится причиной массовой гибели клеток, влекущей функциональную неполноценность органов [52].

Развитие ряда патологий (сердечно-сосудистые, онкологические, воспалительные, нейродегенеративные и другие заболевания) может быть связано с активацией либо, напротив, угнетением летальной программы клеток. В связи с этим особый интерес представляют рассмотрение молекулярных механизмов редокс-зависимой регуляции программированной гибели клеток и оценка их нарушений в патогенезе заболеваний различного генеза.

Интенсивные исследования молекулярных аспектов регуляции летальной программы клеток обусловлены важностью этого процесса для развития организма и поддержания его гомеостаза. Вовлечение апоптоза в регуляцию различных жизненно важных процессов в организме обуславливается наличием большого числа вариантов инициации данной программы.

Одним из наиболее изученных путей запуска апоптоза является рецепторный путь, позволяющий элиминировать клетки с определенной специфичностью при воздействии соответствующих экзогенных факторов (рис. 2). В роли «рецепторов смерти» (death domain – DD) могут выступать TNF-R1, Fas/APO1 (CD95), DR3, DR4, DR5 и DR6 [7]. Внеклеточные части рецепторов семейства TNF (2–6 цистеинобогатых доменов) обладают сходными аминокислотными последовательностями, а цитоплазматические различаются по строению, за исключением рецепторов Fas, TNF, APO3/DR3 и CAR1 [7, 48].

Исследование системы Fas–FasL показало, что в норме CD95 экспрессируется на циркулирующих Т-лимфоцитах памяти, кортикальных тимоцитах, фибробластах, кератиноцитах и гепатоцитах. Однако высокая чувствительность клеток к FasL-индуцированной гибели обуславливается повышением экспрессии Fas на них (например,

в случае активации нейтрофилов, гепатоцитов, CD4⁺-лимфоцитов [378]. В свою очередь, Fas-лиганд может экспрессироваться активированными Т-лимфоцитами, клетками Сертоли и клетками передней камеры глаза [98, 103]. Благодаря взаимодействию мембраносвязанной либо растворимой формы FasL с соответствующим рецептором запускается апоптогенная программа клеток-мишеней при ряде инфекционных (вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекция) и аутоиммунных заболеваний [43, 85, 91, 94, 98].

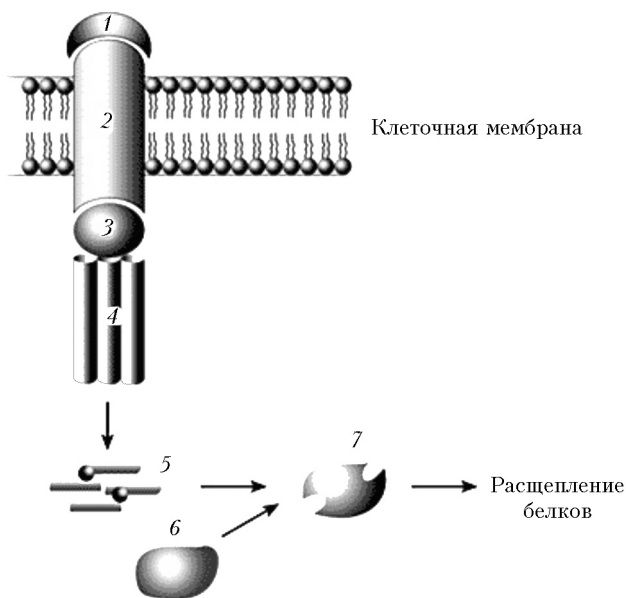


Рис. 2. Рецепторный путь индукции апоптоза (по данным А.В. Гордеевой, Ю.А. Лабас, 2005). Сигнальная молекула (1) связывается с рецептором смерти (2) и далее через адаптерный белок (3) с прокаспазой-8 (4), после чего она превращается в активный фермент каспазу-8 (5). В свою очередь, она активирует прокаспазу-3 (6), которая, став действующим ферментом (7), расщепляет клеточные белки с последующей гибелью клетки

Образование комплекса рецептор – лиганд приводит к кластеризации внутриклеточных участков рецепторных молекул и их взаимодействию с адаптерными белками. Последние ассоциируются с эффекторами (иницирующимися каспазами), вызывая их активацию и запуск эффекторных протеиназ [97, 310, 352]. Возникающие структурно-функциональные изменения внутриклеточных систем способствуют реализации апоптогенной программы [8, 98].

Установлено также, что за адаптерные белки, необходимые для запуска клеточной гибели, конкурируют другие апоптозрегулирующие системы. Так, TNF-ассоциированный домен смерти (TRADD) является адаптерным протеином, общим для TNF-R1- и DR3-зависимой активации каспазы-8 и для NF- κ B, JNK MAPK-путей. Последние блокируют TNF- и APO-3L-индуцированную активацию каспазы-8 через синтез соответствующих белков [149].

Апоптогенный сигнал может исходить не только от «рецепторов смерти», но и от других рецепторов, в частности, рецепторов для цитокинов [148, 461] и глюкокортикоидов [187]. Известно, что ряд цитокинов (интерферон (Interferon – INF) γ , фактор некроза опухоли (Tumor necrosis factor – TNF), β -токоферол, интерлейкины (Interleukin – IL)-1, -10) способны инициировать запуск летальной программы клеток [64, 96]. Другие цитокины (IL-2, -3, -4, -10, INF α , факторы роста) предупреждают реализацию апоптотической гибели клеток через усиление функций белков Bcl-2 и Bcl-X_L [10, 86, 430]. В ряде случаев (INF γ , GR) возможен как про-, так и антиапоптогенный эффект цитокинов в зависимости от типа и функционального состояния клеток [70, 121, 145].

Влияние глюкокортикоидов на реализацию запрограммированной клеточной гибели опосредуется внутриклеточными рецепторами GR [187, 228]. Ядерные GR способны регулировать экспрессию различных генов [465], что сопровождается увеличением экспрессии кальмодулина [305], снижением синтеза IL-2 [228]. Глюкокортикоид-индуцированный апоптоз может запускаться по митохондриальному пути [178], что согласуется с данными об увеличении выработки активных форм кислорода [362] и циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) [231] в таких клетках.

Внутриклеточный (митохондриальный) путь запуска летальной программы связан с изменениями в электронном транспорте [138] и окислительно-восстановительном балансе [364], потерей трансмембранного потенциала митохондриальной мембраны [255], выходом индукторов смерти (цитохром *c* [278], Smac/DIABLO [424, 431], AIF [298], эндонуклеаза G [314]), а также взаимодействием про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 [143, 158, 206] (рис. 3). Различные сигналы, сходящиеся на митохондриях для усиления или ингибирования названных событий и воздействия на нижележащие мишени, обуславливают три основных варианта реализации программы клеточной гибели:

- 1) нарушение электронного транспорта, окислительного фосфорилирования и продукции аденозинтрифосфата (АТФ);

- 2) выход протенинов, запускающих активацию каспаз;
- 3) изменение внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса.

Важнейший элемент реализации данного пути клеточной гибели – формирование в митохондриях пор высокой проницаемости – permeability transition pore (РТР) [100, 178, 232, 398], играющих роль Ca^{2+} -, потенциал-, рН-, НАДФН/НАДФ- и редокс-зависимых каналов. Благодаря им осуществляется изменение трансмембранного потенциала митохондриальной мембраны $\Delta\psi_m$, рН-, транспорта ионов Ca^{2+} и объема матрикса митохондрий [100, 425].

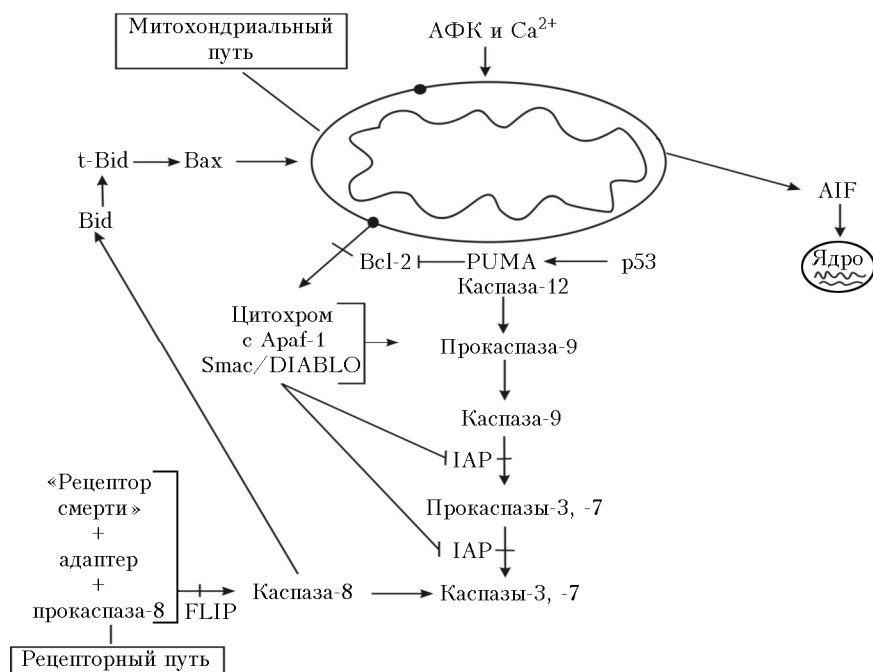


Рис. 3. Взаимоотношение рецепторного и митохондриального путей апоптоза (по данным А.В. Гордеевой, Ю.А. Лабас, 2005): AIF – апоптозиндуцирующий фактор (apoptosis inducing factor); Araf-1 – фактор, активирующий апоптотические протеазы-1 (apoptotic protease activating factor 1); Bax – проапоптотический белок (Bcl-2-associated X protein); Bid – проапоптотический белок (BH3 interacting domain death agonist); Bcl-2 – антиапоптотический белок (B-cell lymphoma 2); FLIP – ингибитор каспаз (FLICE-inhibitory protein); IAP – протеины, ингибирующие апоптоз; PUMA – проапоптотический белок (p53 upregulated modulator of apoptosis); Smac/DIABLO – модулятор апоптоза (ингибирует антиапоптотические белки IAP)

Образование РТР и, соответственно, запуск летальной программы клеток могут быть вызваны различными факторами: истощением внутриклеточных НАДФН₂, АТФ, АДФ и восстановленного глутатиона, разобщением окислительного фосфорилирования, наработкой АФК, возрастанием уровня цитоплазматического Ca²⁺ [3, 398], NO, а также влиянием каспаз, церамида, жирных кислот и амфипатических пептидов [60, 307, 334, 425].

Вместе с тем установлено, что изначальное резкое уменьшение уровня АТФ в клетке при нарушении транспорта электронов и окислительного фосфорилирования убивает ее без возможности реализации энергозависимого процесса апоптоза [256].

Результаты экспериментального исследования Q. Chen и соавт. [197] свидетельствуют о том, что необходимым условием процесса апоптотической гибели клеток (а именно Vc1-ингибируемой ядерной конденсации и ДНК-фрагментации) является присутствие митохондрией. Установлено, что активация каспаз при добавлении деоксиденозинтрифосфата реализуется при выходе цитохрома *c* из митохондрий [278]. Это растворимый белок, локализованный снаружи внутренней мембраны митохондрий, осуществляющий перенос электронов в дыхательной цепи между комплексами III и IV [197]. При инициации апоптогенной программы вышедший в цитозоль цитохром *c* связывается с АРАФ-1 и формирует апоптосому, активирующую прокаспазу-9 [213, 278]. В запуске апоптоза могут участвовать и другие факторы, выделяющиеся из межмембранного пространства митохондрий [133, 186]. Так, флавопротеин А1F, будучи добавленным к изолированным ядрам из клеток HeLa, вызывает конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК, а при добавлении к изолированным митохондриям печени крыс — высвобождение цитохрома *c* и каспазы-9. Микроинъекция А1F в интактные фибробласты у крыс приводит к конденсации хроматина по периферии ядра, разрыву ДНК на крупные фрагменты длиной 50 тыс. пар нуклеотидов и более, диссипации Δψ в митохондриях и переходу фосфатидилсерина из внутреннего слоя плазматической мембраны в наружный. Указанные эффекты А1F не предотвращаются пептидным ингибитором каспаз N-бензоил-оксикарбонил-Va — Ala-Asp-трифторметилкетон (Z-VAD.fmk), хотя последний блокирует цитохром *c*-индуцированный апоптоз. Таким образом, А1F является митохондриальным эффектором программированной клеточной гибели, действующим независимо от каспаз [97].

Инициация программы апоптоза за счет внутриклеточных сигналов может быть связана с нарушением процессов репарации и накоплением разрывов ДНК [107]. Появление таких повреждений отсле-

живается протеином p53 – «стражем генома», способным при необходимости активировать гены белков репарации ДНК. В случае продолжающегося накопления разрывов ДНК p53 подавляет синтез белков клеточного деления, а при достижении критического уровня повреждений индуцирует летальную программу клетки [67, 442].

Наряду с повреждением ДНК причиной апоптоза может являться наличие денатурированных белков в клетке, восстановление которых обеспечивается белками теплового шока hsp70 (heat shock protein 70). При формировании комплексов денатурированный белок – hsp70 снижает содержание свободной формы hsp70, связывающей Araf-1, в результате чего снимается блокировка проапоптогенного цитохрома c [35, 100].

Иницирующий сигнал программированной клеточной смерти может исходить из эндоплазматического ретикулума вследствие локализованной в нем каспазы-12. Показано, что дисбаланс внутриклеточного содержания Ca^{2+} (при воздействии трансигаргина или антибиотика A23187) приводит к активации каспазы-12, что сопровождается увеличением числа апоптотических клеток [292].

Запуск летальной программы инфицированных клеток за счет цитотоксичности лимфоцитов обуславливается действием перфорины. Данный белок формирует каналы в клеточной мембране, что обеспечивает поступление в клетку гранзима В, активирующего каспазу-3 [48, 256].

Аналогичный апоптогенный эффект (за счет действия на каспазу-3) наблюдается в случае нарушения клеточной адгезии. При этом в роли индукторов апоптоза выступают лиганды внеклеточного матрикса (RGD-содержащие белки), связывающиеся с соответствующими интегринами клетки [5].

Запуск программированной клеточной гибели может осуществляться комбинацией различных инициаторных механизмов. Установлено, что выход из митохондрий цитохрома c и его связывание с ARAF-1 могут быть обусловлены внедрением белка Bid в их мембрану. Предшествующая этому активация Bid осуществляется каспазой-8 при реализации рецепторного пути [159, 256].

Многочисленные варианты запуска апоптоза приводят к активации семейства каспаз с различным функциональным назначением. Они представляют собой цистеиновые протеазы со сходной аминокислотной последовательностью и структурой, специфически расщепляющие протеины после остатка аспарагиновой кислоты [97, 352]. Каспазы экспрессируются как проферменты молекулярной массой 30–50 кДа и содержат три домена: NH_2 -концевой, большую и малую

субъединицы. Активная протеаза является гетеродимером, образованным в результате протеолитического процессинга между доменами и ассоциации большой и малой субъединиц проэнзимов [235, 310]. Одни представители семейства сериновых протеаз (инициаторные каспазы) осуществляют передачу апоптогенного сигнала, другие (эффektorные) реализуют летальную программу [97, 110]. К первой группе относятся каспазы-8, -9 и -10, ко второй – каспазы-3, -6 и -7, каспаза-2 может выполнять обе функции. Каспазы-1 и -11 участвуют в реализации воспалительного ответа, а JCE-подобные каспазы-4, -5, -12, -13 и -14 вовлечены как в воспалительный ответ, так и в реализацию летальной программы клеток [110]. Показано, что активация каспаз может обуславливаться действием различных ферментов (гранзим В, катепсины В и G) [113].

По данным Т. Ravid и соавт. [193], каспаза-9 необходима для цитохром с-зависимой активации каспаз-2, -3, -6, -7, -8 и -10. При этом трансактивация каспазы-6 может активировать каспазу-8. Последняя играет ведущую роль в CD95-индуцированной гибели клеток [76, 232, 352], а также способна активироваться гранзимом В, высвобождающимся из цитотоксических Т-лимфоцитов и запускающим апоптогенный каспазный каскад [235].

Действие каспаз первого эшелона (инициаторных) может блокироваться либо усиливаться соответствующими белками-регуляторами. К ним относят ингибиторы апоптоза A1, Bcl-2, Bcl-W, Bcl-X_L, Bcl-1, Mcl-1 и NR13, а также проапоптогенные протеины Bad, Bak, Bax, Bcl-X_s, Bid, Bik, Bim, Hrk, Mtd [195, 274, 305]. Каспаза-8 активирует каспазы второго эшелона – эффекторные (в том числе -3 и -7), в результате чего летальная программа вступает в необратимую стадию (рис. 4). Автокатализ каспазы-3 приводит к активации других протеаз, что вызывает расщепление белка ядерного митотического аппарата и, как следствие, сжатие и фрагментацию ядра [97]. По данным W.C. Earnshaw [235], маркером летальной программы клеток, реализуемой с участием каспазы-3, является фрагментация ДНК (идентифицируется в виде электрофоретической «лестницы»).

Разнообразие субстратов эффекторных каспаз (скелетные и ядерные белки, ферменты репарации ДНК, Ca²⁺, Mg²⁺-эндонуклеазы) позволяет выделить различные механизмы их действия:

- расщепление белков семейства Bcl-2;
- протеолиз ингибитора ДНКазы, ответственной за фрагментацию ДНК. В нормальных клетках апоптозная ДНКаза CAD (caspase-activated DNase) образует неактивный комплекс с ингибитором CAD, обозначаемым I^{CAD} или DFF (DNA fragmentation factor). При апоп-

тозе I^{CAD} с участием каспаз-3 и -7 инактивируется, и свободная CAD, вызывая межнуклеосомные разрывы хроматина, ведет к образованию фрагментов ДНК [235, 310];

– разрушение белков цитоскелета (гельзолин, фодрин, FAK – fokal adhesion kinase, PAK-2 – p21-activated kinase 2) приводит к образованию кластеров апоптотических телец [352];

– гидролиз ядерных белков ламинов способствует конденсации хроматина [232];

– отщепление каталитической и (или) регуляторной субъединицы сигнальных протеинов (Raf-1, PAK2/hPAK65, PCKδ, p21-GAP и др.) [235];

– дисрегуляция функций протеинов, необходимых для процессов репарации и репликации ДНК, сплайсинга мРНК [88, 97, 110].

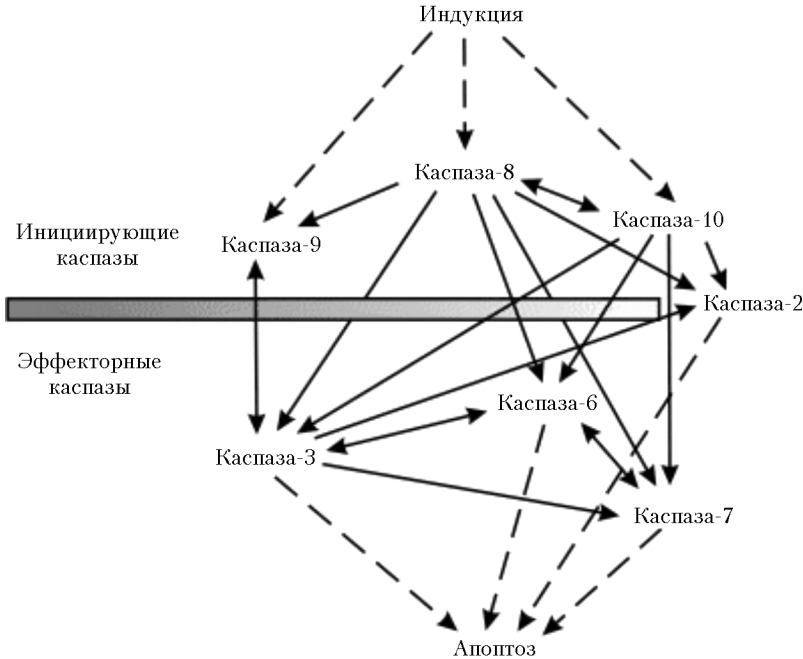


Рис. 4. Функциональные взаимодействия между иницирующими и эффекторными каспазами подсемейства каспазы-3 (по данным В.Д. Самуилова и соавт., 2000)

Каспазы специфически распознают последовательность, состоящую из четырех аминокислотных остатков и обозначаемую как P4–P3–P2–P1. Остаток аспарагиновой кислоты в позиции P1 и остаток

глутамин в позиции РЗ являются наиболее консервативными в данной последовательности каспазного субстрата. В результате гидролиза каспазами биологическая функция их мишеней может активироваться или ингибироваться. Расщепление белков ядерного матрикса вызывает нарушение структурной организации ядра и конденсацию хроматина; разрушение белков цитоскелета (актина и актинсвязывающих белков гельзолина и фодрина) способствует образованию выпячиваний клеточной мембраны и в дальнейшем — распаду клетки с образованием апоптотических телец [446]. Таким образом, активированные апоптотическими сигналами протеазы расщепляют клеточные субстраты, которые вызывают морфологические изменения клетки и деградацию хромосомной ДНК [6]. В частности, отмечается протеолитическое расщепление белка топоизомеразы II, участвующего в формировании структур ДНК высшего порядка (дисковидных структур по 300 тыс. пар оснований (п.о.), объединяющих 6 суперспиральных петель по 5 тыс. п.о.). Именно на такие фрагменты (сначала более крупные — 500 тыс. п.о., а затем мелкие по 50–30 тыс. п.о.) и распадается ДНК [122]. В результате последующей межнуклеосомной деградации ДНК остаются образования из 180 п.о. (или кратных им). Они соответствуют протяженности нити ДНК в нуклеосоме и идентифицируются в виде электрофоретической «лестницы» при исследовании лизатов апоптотических клеток [76].

В ряде случаев (при гиперпродукции апоптогенных белков Bак и Вах) летальная программа клетки может осуществляться без участия каспаз [66, 110, 310].

Важная роль в реализации запрограммированной клеточной гибели принадлежит Ca^{2+} [59]. Установлено, что увеличение содержания свободного Ca^{2+} в клетке приводит к запуску фосфоинозитольных путей регуляции апоптогенной программы, влияет на функцию митохондрий, каспаз и экспрессию Fas-лиганда [10, 155].

Активация каскада цистеиновых и сериновых протеаз ионами кальция вызывает протеолиз ферментов, регулирующих и (или) запускающих каскады реакций, ответственных за реализацию летальной программы [179]. Межнуклеосомная деградация ДНК связана с активацией Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы, а регуляция клеточного цикла — с участием кальция в регуляции транскрипции соответствующих генов [207, 449].

Показано, что Ca^{2+} необходим для процесса сморщивания мембран при апоптозе. С одной стороны, Ca^{2+} индуцирует расщепление цитоскелетных белков протеазами [179], с другой — активирует трансглутаминазу, осуществляющую сшивки между глутаминовыми и

лизиновыми остатками протеинов. Последнее препятствует выходу лизосомального содержимого из клеток [221, 321].

Неотъемлемой частью системы апоптогенных взаимодействий в клетке являются тирозиновые, серинтреониновые и цистеиновые протеинкиназы. Они способны активироваться под влиянием Ca^{2+} , цАМФ, каспаз и протеинов семейства RAS [34, 180, 253, 272, 303]. Установлено, что протеинкиназы могут выполнять как про-, так и антиапоптогенную функцию. Так, протеинкиназа С блокирует реализацию апоптоза (подавление активности фермента может вызвать гибель клеток), а протеинкиназа А является медиатором летальной программы [389, 390]. Действие протеинкиназы С может быть опосредовано образующимися при распаде фосфолипидов регуляторными молекулами [180]. Фосфолипаза С-индуцированный распад глицерофосфолипидов запускает фосфоинозитольный каскад. При этом образование инозитолтрифосфата ведет к высвобождению кальция, а диацилглицерата — к повышению активности протеинкиназы С [272].

Действие других специфичных для сфингомиелина фосфолипаз — сфингомиелиназ — приводит к образованию церамида — вторичного мессенджера, участвующего в IL-1-, TNF- и Fas-опосредованных вариантах апоптоза. Мишенями церамида являются церамидактивированные белки киназы и фосфатазы, обеспечивающие трансдукцию цитокинового сигнала через митогенактивируемые белки и активацию транскрипционного фактора NF- κ B [232, 430]. Церамидиндуцированный синтез ганглиозида GD-3 приводит к изменению трансмембранного потенциала митохондрий, т.е. к каспазозависимому запуску апоптоза [292]. Кроме того, церамид влияет на экспрессию генов, кодируемых продуктами онкогенов и подавляет активность протеиназ. Последние наряду с фосфатазами способны фосфорилировать (активировать) антиапоптотический белок Bcl-2 [464].

Таким образом, апоптоз представляет собой регулируемую на молекулярном уровне летальную программу, реализация которой зависит от баланса про- и антиапоптогенных факторов. Его нарушение (как в сторону активации, так и в сторону ингибирования) может служить одним из важнейших механизмов развития различных патологических процессов.

1.3. Редокс-чувствительные механизмы регуляции апоптоза

Программированная гибель клеток играет важную роль в регуляции дифференцировки и поддержании тканевого гомеостаза организма.

Течение многих патологических процессов сопряжено с нарушением реализации программы апоптоза. Вместе с тем, активным участником сигнальной трансдукции, влияющим на ключевые звенья метаболических процессов в клетке, являются АФК. В частности, они выступают в качестве вторичных мессенджеров при индукции и регуляции клеточного саморазрушения.

Редокс-чувствительная регуляция программы апоптоза нарушается при активации процессов свободнорадикального окисления и (или) недостаточности антиоксидантной системы (т.е. в условиях окислительного стресса) [57, 100, 304]. Значительное число исследований показывает важную роль свободнорадикального механизма запуска апоптоза [57, 100, 155, 265, 290, 304, 316, 334, 416]. С окислительным стрессом связана индукция летальной программы клеток при воздействии на них ионизирующего и ультрафиолетового излучений, некоторых лекарственных веществ [12, 65]. Показано участие АФК и перекисных соединений в индукции апоптоза нормальных (нейтрофилы, лимфоциты, эндотелиоциты, клетки Лейдига) [107, 238, 264, 304] и опухолевых клеток [119]. Действие АФК может обуславливаться образованием цАМФ [59], а также окислением фосфатидилсерина с появлением его во внешнем слое плазматической мембраны [100]. Связывание фосфатидилсерина с соответствующим рецептором лейкоцитов инициирует летальную программу клеток-мишеней. В ряде случаев сам лейкоцит выделяет супероксид, окисляющий фосфатидилсерин, усиливая таким образом апоптогенный сигнал [100, 110]. Важную роль в регуляции АФК-зависимого апоптоза играют антиоксидантные механизмы защиты клетки; модуляция апоптоза определяется состоянием динамического баланса про- и антиоксидантных процессов [9, 10, 264, 304, 316].

Многочисленные данные литературы свидетельствуют о том, что АФК оказывают влияние на реализацию различных путей запуска программированной гибели клеток: рецепторного, митохондриального и ядерного.

Так, согласно исследованиям А.К. Garg и В.В. Aggarwal [249], воздействие фактора некроза опухоли (т.е. стимуляция TNF-рецепторов) на трансформированные фибробласты мышцы сопровождается продукцией ОН-радикалов и реализацией цитотоксического эффекта. В качестве ингибиторов TNF-индуцированного апоптоза выступают антиоксиданты тиреодоксин и N-ацетилцистеин. Апоптоз Fas-положительных моноцитов также связан с возрастанием внутриклеточного содержания АФК. Показано, что ингибиторами данного варианта клеточной гибели являются T-ацетилцистеин и восстановлен-

ный глутатион [45]. Глюкокортикоидиндуцированный апоптоз клеток простаты и незрелых Т-лимфоцитов крыс обусловлен индукцией редокс-чувствительной глутатион-S-трансферазы [469].

Одной из мишеней АФК в клетке (а также их источником) являются митохондрии [66, 100], занимающие важнейшее место в реализации программы апоптоза. Возрастание концентрации $O_2^{\cdot-}$ и перекисных соединений вызывает образование пор внутренней митохондриальной мембраны [100, 178, 316, 425]. Происходит выход в цитозоль различных апоптозиндуцирующих факторов: цитохрома с [278], Smac/DIABLO [424; 431], AIF [298], а также эндонуклеазы G [314]. Высокий уровень АФК в клетке активирует митохондриальный электронный транспорт, при этом увеличивается продукция перекиси водорода и снижается синтез АТФ. В свою очередь, усиление генерации H_2O_2 приводит к открытию митохондриальных пор и выходу цитохрома с в цитозоль [106].

Митохондрии являются не единственной редокс-чувствительной системой клетки. Показано, что повышение уровня АФК активирует сигналпередающие (и, в частности, MAP-киназные) пути, запуская каскады реакций фосфорилирования. Ответственные за стрессовые воздействия MAP-киназы (JNK, p38, Erk5) активируются под влиянием АФК и передают сигнал в виде последовательного фосфорилирования ферментов. В частности, JNK может влиять на реализацию летальной программы клеток путем активации фактора транскрипции p53, проапоптотических протеинов Bad и Bax и (или) фосфорилированием и инактивацией антиапоптотических белков семейства Bcl-2 [297].

Адаптивная реакция клетки в ответ на изменение уровня АФК обеспечивается индукцией факторов транскрипции (NF-κB, AP-1, p53, Nrf2 и др.). Так, редокс-чувствительный транскрипционный фактор NF-κB стимулирует выживание клеток опухолей за счет активации генов антиапоптотических белков Bcl-X_L, x-IAP, cIAP и A20 [448]. С генерацией АФК связан p53-зависимый апоптоз, поскольку перекись водорода индуцирует однонитевые разрывы ДНК, что приводит к усилению экспрессии p53 [107]. Установлено, что при индукции p53 в эксперименте 35% клеток, экспрессирующих p53, подвергались апоптозу. Присутствие антиоксиданта NAC (N-ацетилцистеин) снижало число апоптотических клеток [260, 358].

Таким образом, активные формы кислорода оказывают существенное влияние на регуляцию программы гибели клетки, опосредуя свое действие через различные механизмы индукции апоптоза.

В целом представленные в настоящей главе данные современной литературы свидетельствуют о наличии сложных механизмов регуляции

апоптоза. Нарушение реализации программы клеточной гибели вследствие дисбаланса про- и антиапоптогенных факторов приводит к патологическим изменениям органов и тканей. Показано, что при ряде заболеваний изменяется состояние внутри- и внеклеточных сигнальных путей регуляции апоптоза, в том числе редокс-зависимых.

Развитие окислительного стресса при ряде патологий связано с резкой интенсификацией процессов свободнорадикального окисления и (или) снижением резерва антиоксидантов, что приводит к значительному нарастанию уровня АФК. Последние вызывают окислительную модификацию биомолекул, активацию протеолитических ферментов, нарушение структуры мембран и метаболизма Ca^{2+} .

С действием АФК связана активация митогенактивируемых протеинкиназ, некоторых факторов транскрипции (NF- κ B, p53 и др.). Последние фосфорилируют белки-мишени, регулирующие программированную гибель клеток. Таким образом, АФК (через киназы, факторы транскрипции, а также непосредственно воздействуя на редокс-чувствительные белки-регуляторы) оказывают существенное влияние на регуляцию апоптоза и клеточную пролиферацию. При этом активизация свободнорадикальных процессов вносит существенный вклад в развитие дисбаланса про- и антиапоптогенных факторов.

Несмотря на накопленный к настоящему времени фактический материал о роли отдельных редокс-чувствительных элементов в трансдукции апоптогенных сигналов, имеются значительные пробелы в оценке исходов их активации в зависимости от природы индуцирующего сигнала и сопутствующих условий стимуляции. Неоднозначность влияния данных элементов сигнальной трансдукции на реализацию апоптоза (табл. 1) затрудняет понимание их роли в возникновении нарушений летальной программы клеток, сопряженных с развитием большого числа заболеваний. Известно, что развитие различных болезней (злокачественные новообразования, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, острые и хронические воспалительные процессы, сахарный диабет и др.) связано с интенсификацией процессов свободнорадикального окисления. В то же время важным фактором патогенеза данных заболеваний является нарушение программированной гибели клеток, приводящее к ее излишнему активированию или ингибированию. Однако молекулярные основы участия АФК в дисрегуляции летальной программы клеток изучены не полностью и требуют детализации, что позволит идентифицировать мишени для коррекции дисрегуляции апоптоза при большом числе патологий. В связи с этим представляется целесообразным выявить

потенциальные мишени воздействия АФК для поиска патогенетически обоснованных подходов к терапии заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом.

Таблица 1

Данные о про- и антиапоптотической функции редокс-чувствительных элементов системы сигнальной трансдукции клеток

| Редокс-чувствительные элементы системы сигнальной трансдукции | Авторы и год опубликования | |
|---|--|---|
| | Проапоптотическая функция | Антиапоптотическая функция |
| МАР-киназа JNK | R.K. Srivastava, 1999 V.L. Gabai и соавт., 2000 H.M. Beere, 2005 | P. Andrek и соавт., 2001 |
| МАР-киназа р38 | M. Torcia и соавт., 2001 M. Mayт и соавт., 2002 S.J. Kim и соавт., 2002 | C. Communal и соавт., 2000 R. Craig и соавт., 2000 H.E. Hoover и соавт., 2000 |
| Фактор транскрипции р53 | L. Zhang и соавт., 2002 J.S. Fridman, S.W. Lowe, 2003 Z. Feng и соавт., 2005 | C. Communal и соавт., 2000 R. Craig и соавт., 2000 H.E. Hoover и соавт., 2000 |
| Фактор транскрипции NF-κB | J. Kucharczak и соавт., 2003 S. Rocha и соавт., 2005 | K.J. Campbell, N.D. Perkins, 2006 |

Механизмы дисрегуляции апоптоза при окислительном стрессе мы рассматривали с позиции существования типовых неспецифических механизмов нарушения летальной программы клеток.

Чтобы понять особенности влияния окислительного стресса на реализацию апоптоза, на базе межкафедральной научно-образовательной лаборатории молекулярной медицины Сибирского государственного медицинского университета (СибГМУ) (г. Томск), а также лаборатории фармакогеномики НИИ химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск) было проведено комплексное исследование молекулярных механизмов данного явления.

На первом этапе исследования предстояло выяснить, приводит ли дисбаланс окислительного метаболизма к нарушению реализации летальной программы клеток. Для этого проводили оценку выраженности апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови в условиях окислительного стресса, состояния ключевых путей инициации программированной гибели клеток (рецепторный, митохондрий-опосредованный, ядерный).

На втором этапе исследования предполагалось проверить гипотезу о вовлечении редокс-чувствительных элементов сигнальной трансдукции

(митогенактивированных протеинкиназ р38 и JNK, транскрипционных факторов р53 и NF-κB, белков семейства Bcl-2) в механизмы нарушения летальной программы клеток при окислительном стрессе.

Для верификации молекулярных мишеней, ответственных за редокс-зависимую модуляцию апоптоза, проводилось манипулирование *in vitro* мононуклеарными лейкоцитами крови, полученными у здоровых доноров и больных острыми воспалительными заболеваниями.

В исследование были включены 46 здоровых доноров (20 мужчин, 26 женщин) в возрасте от 18 до 50 лет и 49 больных (25 мужчин и 24 женщины) в возрасте от 18 до 50 лет (средний возраст (32 ± 6) года) с острыми воспалительными заболеваниями (внебольничная пневмония, острый аппендицит). Критериями исключения из программы исследования для здоровых доноров и пациентов с острыми воспалительными заболеваниями являлись возраст моложе 18 и старше 50 лет; период обострения хронических воспалительных заболеваний; аутоиммунные, наследственные и психические болезни, злокачественные новообразования, алкогольная и наркотическая зависимости; отсутствие информированного согласия.

Пациенты были обследованы при госпитализации в терапевтическое и хирургическое отделения ММЛПУ «Городская больница № 1», госпитальные клиники СибГМУ, клиники Томского военно-медицинского института.

Обследование проводилось при поступлении больных в стационар, что соответствовало периоду разгара болезни (1–е–3–и сут от начала заболевания). В программу исследования были включены 20 (12 мужчин и 8 женщин) пациентов с диагнозом «острый аппендицит», в том числе 13 пациентов с послеоперационным диагнозом «острый флегмонозный аппендицит», 6 пациентов с острым гангренозным аппендицитом и 1 больной острым катаральным аппендицитом. В клиническую группу пациентов с внебольничной пневмонией были включены 29 человек (13 мужчин и 16 женщин), которые доставлялись по скорой медицинской помощи для госпитализации с предварительным диагнозом внебольничной пневмонии. В результате проведенных исследований у 40% пациентов определялось инфицирование *Mycoplasma pneumoniae*, у 60% больных – *Pneumococcus (Streptococcus pneumoniae)*. Правое легкое было поражено в 44% случаев, левое – в 56%.

Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез [30, 55]. Проверку нормальности распределения количественных показателей выполняли с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Для нормально распределенных выборок вычисляли средневыборочные характеристики: среднее арифметическое значение \bar{X} , среднее квадратичное отклонение σ , ошибку среднего m . Для выборок, распределение которых отличалось от нормального, рассчитывали медиану Me , первый и третий квартили – Q_1 , Q_3 соответственно. При соответствии нормальному закону распределения

признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. В случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением достоверность различий оценивали с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни (для независимых выборок) и Вилкоксона (для зависимых выборок). При анализе использовали метод корреляционного анализа Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [30, 55].

При выборе методологии исследования авторы руководствовались следующими позициями. С одной стороны, известно, что окислительный стресс выступает в качестве важного патогенетического фактора развития различных заболеваний (воспалительные процессы любого генеза, злокачественные новообразования, сердечно-сосудистая и бронхолегочная патологии, неврологические и психические заболевания, интоксикации разного генеза и др.). При этом механизмы генерации АФК носят типовой универсальный характер [42]. В качестве примера патологического процесса, сопровождающегося дисбалансом окислительного метаболизма, был выбран острый воспалительный процесс у больных внебольничной пневмонией и острым аппендицитом.

С другой стороны, изучение роли какого-либо определенного молекулярного механизма требует создания экспериментальной модели, существенным преимуществом которой является возможность анализа изолированной цепи событий, приводящих к патологическим изменениям [19]. В связи с этим в программу исследования был включен экспериментальный блок, основанный на моделировании окислительного стресса *in vitro* с использованием H_2O_2 .

Проведенное исследование позволило установить последовательность молекулярных событий, обуславливающих нарушение программированной гибели клеток в условиях окислительного стресса. Их детальному описанию посвящены следующие главы монографии.

Глава 2

ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ АПОПТОЗА МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Интенсификация окислительных реакций при различных патологических состояниях может оказывать влияние на процессы реализации апоптоза (как в сторону активации, так и в сторону ингибирования), выступая в качестве дополнительного патогенетического механизма развития сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний, воспалительных и нейродегенеративных процессов. Особый интерес исследователей в этом плане вызывает роль изменений редокс-статуса клетки в модуляции ее программированной гибели [65, 74]. Вместе с тем особенности функционирования отдельных систем передачи апоптогенных сигналов (вне- и внутриклеточных) в условиях изменения окислительного метаболизма требуют детального изучения. Оценке роли рецепторного (в частности, TNF-опосредованного) и митохондриального путей в запуске летальной программы клеток при окислительном стрессе посвящена данная глава монографии.

Окислительный стресс индуцирует типовые изменения структуры различных клеточных систем независимо от специфичности клеточной линии. В качестве объекта исследования были выбраны мононуклеарные лейкоциты крови (лимфоциты и моноциты).

Выделение мононуклеарных клеток из цельной венозной крови производили методом градиентного центрифугирования [58].

Гепаринизированную кровь (25 Ед/мл) наслаивали на градиент плотности Ficoll-Paque ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) («GE Healthcare», Швеция) в соотношении 1:1 и центрифугировали в течение 20 мин при 1 500 об/мин. Интерфазное кольцо мононуклеарных лейкоцитов собирали пипеткой и трижды отмывали средой RPMI-1640, центрифугируя по 10 мин при 1 500 об/мин. Жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов оценивали с помощью 0,5%-го трипанового синего («Serva», США), который смешивали с 0,1 мл суспензии клеток в равных объемах. Доля «мертвых» клеток, содержащих краситель, не превышала 5%.

Закономерности изменения молекулярных механизмов функционирования мононуклеарных лейкоцитов с определенной долей коррекции, связанной с видовой специфичностью, могут быть экстраполированы на другие клеточные системы. В частности, для них

характерна реализация апоптотической гибели с участием основных сигналпередающих путей. Кроме того, мононуклеарные лейкоциты доступны для детального изучения как в клинике, так и в эксперименте. Данное обстоятельство позволило реализовать экспериментальный и клинический блоки комплексного исследования как разные варианты тестирования изучаемых характеристик и выявления общих закономерностей (особенностей) дисрегуляции апоптоза мононуклеарных клеток в условиях окислительного стресса *in vitro* и при патологии.

2.1. Моделирование окислительного стресса мононуклеарных лейкоцитов крови *in vitro*

На сегодняшний день известно множество способов моделирования окислительного стресса как *in vivo*, так и *in vitro*: модель гипобарической гипоксии, создание ишемии двусторонней окклюзии сонных артерий, использование линии быстростареющих мышей (SAM – senescence-accelerated mice) [12, 13], модель ультрафиолетового облучения в монослойных культурах фибробластов кожи новорожденных крысят [49], использование ксантин-ксантинооксидазной реакции [153], добавление в культуру клеток терт-бутил-гидроперекиси [40] и др. В опытах на изолированном сердце крысы добавление в перфузионный раствор O_2^- -генерирующей системы ($FeSO_4$ в концентрации 0,2 ммоль и аскорбата в концентрации 0,5 ммоль) индуцировало окислительный стресс [89]. Кроме того, моделирование супероксидного стресса различной степени выраженности в культуре бактериальных клеток осуществляли с помощью параквата в конечной концентрации 10–20 мкг/мл (слабая степень выраженности) и 30–80 мкг/мл (умеренно и сильно выраженный стресс) [105]. Индукция окислительного стресса в нейронах *in vitro* достигалась N-метил-D-аспаратом (NMDA), активирующим соответствующий класс ионотропных глутаматных рецепторов. Инкубирование выделенных из мозжечка нейронов у крыс и мышей линии SAMP1 с различными концентрациями NMDA сопровождалось дозо- и времязависимым приростом уровня АФК [14].

Однако одним из наиболее распространенных способов моделирования окислительного стресса *in vitro* является добавление в культуральную среду H_2O_2 в различных конечных концентрациях [136, 199, 211, 338].

Использование перекиси водорода в качестве индуцирующего окислительный стресс агента имеет ряд преимуществ. Известно, что H_2O_2 является побочным продуктом работы цепи окислительного фосфорилирования, образуясь в клетке в физиологических условиях.

Молекула перекиси водорода является стабильной, а возрастание внутриклеточной продукции H_2O_2 представляет собой неотъемлемый элемент адаптивных реакций. Экзогенная H_2O_2 в силу электростатической нейтральности способна легко проникать через гидрофобные мембраны. Показано, что большинство клеток устойчивы к воздействию экзогенной перекиси водорода в концентрации менее 50 ммоль. При этом H_2O_2 в концентрациях 0,1–50 ммоль может вызывать различные функциональные изменения в клетках, выступая в качестве внутриклеточного мессенджера [29, 100, 107]. Однако существуют данные, свидетельствующие об индукции окислительного стресса и другими концентрациями H_2O_2 . Так, в клетках эпидермальной карциномы человека A431 Е.Б. Бурова и соавт. [18] инициировали окислительный стресс добавлением H_2O_2 в концентрации 1–2 ммоль.

Установлено, что перекись водорода вызывает усиление секреции простагландинов E2 и E12, интенсификацию синтеза фактора активации тромбоцитов, активатора тканевого плазминогена, снижает связывание фактора некроза опухоли за счет уменьшения числа соответствующих рецепторов на поверхности эндотелиоцитов [104, 116]. Благодаря данным свойствам перекись водорода выступает в роли одного из ключевых участников внутриклеточной и межклеточной сигнализации [74].

Задачей настоящего раздела экспериментального исследования являлась оценка уровня внутриклеточной продукции АФК и апоптотически измененных мононуклеарных лейкоцитов при действии перекиси водорода различной концентрации. При этом оптимальной для моделирования окислительного стресса *in vitro* считалась концентрация H_2O_2 , при которой внутриклеточный уровень АФК, превышая контрольные значения и вызывая интенсификацию процессов апоптоза, не приводил к возрастанию числа некротизированных клеток в культуре.

Выделенные в стерильных условиях мононуклеарные лейкоциты респендировали в полной питательной среде (90% RPMI-1640, 10% инактивированной (при температуре 56 °С в течение 30 мин) эмбриональной телячьей сыворотке («Биолот», г. Санкт-Петербург), L-глутамин в концентрации 0,3 мг/мл, гентамицин в концентрации 100 мкг/мл, NEPEP в концентрации 2 ммоль/мл (Flow, Великобритания)). Количество мононуклеарных лейкоцитов подсчитывали в камере Горяева и разводили полной питательной средой до получения $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл среды. Клетки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37 °С и 5% CO_2 в стерильных пенициллиновых флаконах и 96-луночных круглодонных иммунологических планшетах.

Для этого в стерильные пенициллиновые флаконы и 96-луночные круглодонные иммунологические планшеты вносили суспензию мононук-

леарных лейкоцитов, доводили полной культуральной средой до концентрации $2 \cdot 10^6$ /мл и вносили H_2O_2 в конечной концентрации 10, 50, 100, 500 мкмоль, 1 и 5 ммоль. Клетки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37 °С и 5% CO_2 . Следует отметить, что выбранные концентрации перекиси водорода являются часто используемыми для индукции экспериментального окислительного стресса при изучении его влияния на различные внутриклеточные процессы [29].

Инкубация моноцитов (лимфоцитов) периферической крови, полученных у здоровых доноров, с перекисью водорода в диапазоне концентраций от 10 до 500 мкмоль не приводила к значимым отклонениям исследуемого показателя от контрольных значений ($p > 0,05$) (табл. 2).

Для измерения уровня активных форм кислорода в клетках использовали дихлорфлуоресцеина диацетат (ДХФ-ДА) («Sigma Aldrich», США), который является красителем с заблокированной флуоресценцией. После пассивного проникновения в клетку и отщепления ацетатной группы под действием эстераз ДХФ-ДА переходит в полярное соединение, не обладающее способностью к диффузии из клетки. В результате взаимодействия с H_2O_2 и другими свободными радикалами ДХФ-ДА становится флуоресцирующим соединением.

В чистую полистириновую пробирку помещали 90 мкл суспензии мононуклеарных лейкоцитов ($2 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл) и 10 мкл рабочего раствора ДХФ-ДА. Клетки ресуспендировали и инкубировали в течение 20 мин при температуре 37 °С. Затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин, сливали надосадок и добавляли 400 мкл ФСБ. Пробы помещали на лед, уровень продукции АФК анализировали по интенсивности свечения красителя (FL-1 канал) на проточном цитофлуориметре «Erics XL» («Beckman Coulter», Франция).

Значения исследованного параметра выражали в условных единицах (интенсивность свечения на клетку).

Полученные результаты свидетельствуют об эффективной работе антиоксидантной системы моноцитарных клеток крови, инкубированных с перекисью водорода в концентрациях от 10 до 500 мкмоль. Известно, что устойчивость клеток к воздействию H_2O_2 обеспечивается глутатионпероксидазной и каталазной ферментативными системами [65]. Глутатионпероксидаза катализирует реакцию восстановления глутатионом нестойких органических гидропероксидов в стабильные соединения — оксикислоты. Восстановление окисленного глутатиона осуществляется с участием НАДФН-зависимой глутатионредуктазы. Подавляющая часть (70%) глутатионпероксидазы локализована в цитозоле клеток, а незначительная — в митохондриях [447]. И, наоборот, меньшая часть каталазы, участвующей в разложении перекиси, содержится в цитозоле клеток (20%), так как основное ее количество

(80%) приходится на пероксисомы [13]. Поскольку сродство глутатионпероксидазы к H_2O_2 выше, чем каталазы, она защищает клетки от низких концентраций перекиси водорода, тогда как каталаза эффективна при высоких ее концентрациях [17, 21].

Таблица 2

Внутриклеточное содержание активных форм кислорода, количество мононуклеарных лейкоцитов крови со сниженным трансмембранным потенциалом и апоптотически измененных клеток в условиях их культивирования *in vitro* с различными концентрациями перекиси водорода ($Me(Q_1-Q_3)$)

| Регистрируемый показатель | Уровень АФК в клетке, усл. ед. | Количество аннексинположительных клеток, % | Количество клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом, % |
|--|--|---|---|
| Интактная культура | 0,24 (0,19–0,33) | 1,36 (0,99–2,15) | 1,35 (1,10–1,65) |
| Инкубирование с H_2O_2 в концентрации 10 мкмоль | 0,13 (0,06–0,21) $p_1 > 0,05$ | 1,84 (1,02–2,08) $p_1 > 0,05$ | 1,63 (1,19–1,94) $p_1 > 0,05$ |
| Инкубирование с H_2O_2 в концентрации 50 мкмоль | 0,11 (0,07–0,22) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ | 1,51 (1,07–2,17) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ | 1,73 (1,33–2,61) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ |
| Инкубирование с H_2O_2 в концентрации 100 мкмоль | 0,28 (0,21–0,35) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ | 1,82 (0,72–2,77) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ | 1,60 (0,91–3,22) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ |
| Инкубирование с H_2O_2 в концентрации 500 мкмоль | 0,28 (0,27–0,33) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$ | 1,74 (0,81–2,16) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$ | 1,62 (1,05–2,46) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$ |
| Инкубирование с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль | 0,61 (0,54–0,68) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,05$ $p_5 < 0,05$ | 13,11 (12,17–15,13) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,05$ $p_5 < 0,05$ | 9,21 (6,17–12,55) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,05$ $p_5 < 0,05$ |

Примечание. p_1 – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями в интактной культуре мононуклеарных лейкоцитов; p_2 – по сравнению с культурой клеток, инкубированной с H_2O_2 в концентрации 10 мкмоль; p_3 – по сравнению с культурой клеток, инкубированной с H_2O_2 в концентрации 50 мкмоль; p_4 – по сравнению с культурой клеток, инкубированной с H_2O_2 в концентрации 100 мкмоль; p_5 – по сравнению с культурой клеток, инкубированной с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль.

Добавление в культуру мононуклеарных лейкоцитов перекиси водорода в концентрации 1 ммоль приводило к достоверному увеличению уровня внутриклеточных АФК по сравнению с таковым в интактных клетках ($p < 0,05$) (см. табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о нарушении баланса между про- и антиоксидантными системами клетки и могут служить признаком развития окислительного стресса. Известно, что в норме незначительная часть потребляемого митохондрией кислорода (не более 4%) переходит при одноэлектронном восстановлении (начальный этап электронной транспортной цепи) в высокотоксичный супероксид-анион-радикал. Митохондриальная супероксид-дисмутаза обеспечивает превращение O_2^- в H_2O_2 , которая может перейти в высокотоксичный гидроксил-радикал в реакции Фентона. При различных внешних воздействиях, приводящих к разобщению окислительного фосфорилирования, электроны перераспределяются с электронной транспортной цепи в АФК-продукцию [68, 106].

2.2. Закономерности реализации летальной программы мононуклеарных лейкоцитов при окислительном стрессе

Помимо окислительного стресса, носящего как адаптивный, так и дезадаптивный характер, одним из фундаментальных механизмов регуляции клеточного гомеостаза является апоптоз. В связи с этим чрезвычайно интересна взаимозависимость и участие АФК в регуляции клеточного саморазрушения [45].

Процесс программированной гибели клеток характеризуется различными метаболическими и структурными изменениями: падением трансмембранного потенциала митохондрий, активацией каспаз, фрагментацией ДНК и формированием апоптотических телец. Показано, что ранним признаком апоптогенных нарушений может служить изменение локализации фосфатидилсерина, а точнее – его перемещение с внутренней стороны клеточной мембраны на внешнюю. Последнее, согласно S.J. Martin и соавт. [234], предшествует появлению других морфологических признаков апоптоза независимо от индуцирующего сигнала и характерно для различных типов клеток человека. При блокировании апоптогенной программы (ингибирование синтеза АТФ, повышенная экспрессия Bcl-2) появления фосфатидилсерина на наружной клеточной мембране не происходит [234]. Изменение локализации молекул фосфатидилсерина обуславливается снижением активности аминокислотной трансферазы, ответственной за

сохранение асимметрии мембранного бислоя, и неспецифическим перемещением фосфолипидов по принципу флип-флоп [140]. Исходя из факта присутствия фосфатидилсерина на поверхности мембраны апоптозных клеток, их регистрация может осуществляться с помощью соединения, обладающего сродством к нему, — ФИТЦ-меченного аннексина V [140]. Именно такой методологический подход был использован в данном исследовании.

Для оценки реализации апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови использовали меченый флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ) аннексин V из набора реагентов Annexin V FITC («Beckman Coulter», Франция).

К 200 мкл суспензии мононуклеарных лейкоцитов ($2,0 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл) добавляли 400 мкл охлажденного на льду фосфатно-солевого буфера (ФСБ) («Helikon», США), центрифугировали в течение 5 мин при 1 500 об/мин. Сливали надосадок и ресуспендировали оставшиеся клетки в 100 мкл Ca^{2+} -связывающего буфера. После добавления 1 мкл Annexin V FITC и перемешивания на центрифуге вортекс пробы помещали на лед и инкубировали 10 мин в темноте. Затем добавляли 400 мкл охлажденного буфера и перемешивали.

Анализ проб производили на проточном цитометре «Epicс XL» («Beckman Coulter», Франция) с аргоновым лазером, определяя несколько параметров: малое угловое светорассеивание (FSC), характеризующее размер клетки, боковое светорассеивание (SSC), характеризующее цитоплазматические, а также мембранные особенности клетки, и показатель зеленой флуоресценции (ФИТЦ — 530 нм). Исследуемую популяцию клеток гейтировали в координатах FSC (ось абсцисс) и SSC (ось ординат), затем анализировали на наличие флуоресценции в координатах на основе Dot Plot. Использовали автоматическое программное обеспечение и методы сбора и анализа данных с высоким разрешением (1 024 канала).

Полученные результаты представляли в процентах (соотношение числа аннексинположительных клеток к общему числу мононуклеарных лейкоцитов).

Инкубация клеток с перекисью водорода в диапазоне концентраций от 10 до 500 мкмоль не приводила к возрастанию числа аннексинположительных клеток (см. табл. 2). Данный факт соответствует выявленному отсутствию влияния указанных концентраций H_2O_2 на содержание внутриклеточных АФК, что может служить косвенным признаком сохранения окислительно-восстановительного баланса клеток. Вероятно, в описанных условиях не происходит активации редокс-зависимых систем сигнальной трансдукции, ответственных за реализацию летальной программы клеток.

Значительное возрастание (по сравнению с контролем — $p < 0,05$) относительного количества аннексинположительных клеток было зарегистрировано в культуре мононуклеарных лейкоцитов при индукции окислительного стресса H_2O_2 в концентрации 1 ммоль на фоне

избыточной внутриклеточной продукции АФК (см. табл. 2; рис. 5). Обнаруженная однонаправленность изменений указанных показателей является свидетельством участия АФК в реализации программированной гибели клеток.

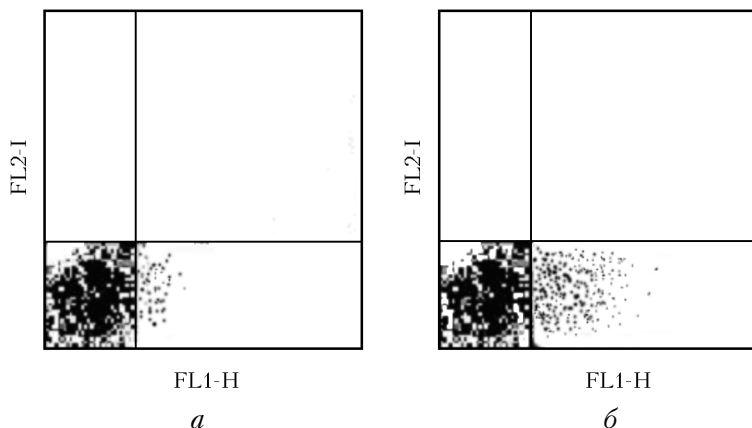


Рис. 5. Изменение количества аннексинположительных мононуклеарных лейкоцитов крови при добавлении в культуру клеток перекиси водорода в концентрации 1 ммоль: *a* – интактная культура клеток; *б* – культивирование клеток с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль

Культивирование мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, с H_2O_2 в концентрации, превышающей 1 ммоль, приводило к возрастанию в культуре числа некротизированных клеток, определяемых при окраске трепановым синим. Данное обстоятельство заставило исключить дальнейшее исследование влияния перекиси водорода в концентрации более 1 ммоль на процесс апоптоза.

Как известно, реализация апоптогенной программы представляет собой три последовательные стадии: инициация, эффекторная и деградация [308, 446]. Особенно сложным и многоуровневым процессом является начальная стадия, так как запуск программы клеточной гибели может инициироваться большим числом разнообразных факторов. Исследование различных путей инициации апоптоза способствует более глубокому пониманию механизмов его дисрегуляции при окислительном стрессе, поэтому в ходе настоящего исследования оценивались основные варианты запуска программированной гибели клеток: митохондриальный, рецепторный ($TNF\alpha$ -опосредованный) и ядерный (p53-опосредованный).

К настоящему времени накоплено большое количество данных, подтверждающих взаимосвязь между генерацией АФК, функцией митохондрий и реализацией апоптоза [74]. Показано, что митохондрии могут выступать в качестве мишеней регуляторных молекул при передаче апоптогенного сигнала, а также в роли источника АФК, являющихся сигнальными молекулами данных каскадов [256, 469].

Митохондриальный путь инициации программы апоптоза включает изменения электронного транспорта и клеточного редокс-баланса, потерю митохондриального трансмембранного потенциала, взаимодействие про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2, выход апоптогенных факторов (цитохром *c*, AIF, Smac/DIABLO) [143, 206, 278, 298, 314, 424, 431]. Следующий этап – активация прокаспазы-9 – происходит в цитоплазме благодаря цитохрому *c* и цитоплазматическому фактору Araf-1 (apoptosis protease activating factor 1). Последний (130 кДа) содержит CARD-домен на N-конце и 12 повторяющихся аминокислотных WD-40-последовательностей (WD – дипептид из триптофана и аспартата) на C-конце. Данный белок формирует комплекс с прокаспазой-9 в присутствии цитохрома *c* и dATP или ATP – апоптосому (1,3 млн Да), содержащую не менее 8 субъединиц Araf-1. При этом прокаспаза-9 связывается в эквимолярном соотношении с ARAF-1 (гомофильное CARD-CARD-взаимодействие) и активирует прокаспазу-3 [59, 97]. Активация каспазы-9 может быть усилена Smac/DIABLO и Omi/HtrA2, блокирующими белки-ингибиторы апоптоза IAP, что ведет к запуску суицидальной программы [348].

Таким образом, выход апоптоз-индуцирующих факторов из межмембранного пространства митохондрии возможен только при повышении проницаемости ее наружной мембраны. Исходя из представленных данных, в качестве показателя, характеризующего вовлеченность митохондриального пути в реализацию апоптоза при окислительном стрессе, оценивалась целостность митохондриальных мембран по показателю трансмембранного потенциала. Последний является электрохимическим градиентом протонов, создаваемым цепью переноса электронов на внутренней мембране митохондрий. Рассеивание $\Delta\psi$ может происходить за счет открытия неселективных пор пермеабилитационного перехода между наружной и внутренней мембранами митохондрий [436]. В состав данных каналов входят транслокатор адениловых нуклеотидов, потенциалзависимый анионный канал (порин) и бензодиазепиновый рецептор внешней мембраны [181], белки семейства Bcl-2, циклофилин D и ферменты энергетического метаболизма – гексокиназа и креатинкиназа. Воздействие АФК и ионов кальция приводит к преобразованию данного комплекса в пору диамет-

ром 2,6–2,9 нм. Установлено, что АФК окисляют SH-группы Cys-56 АТФ/АДФ антипортера мембраны митохондрий [68, 106]. Данные поры способны пропускать низкомолекулярные вещества с массой 1,5 кДа и ниже, в связи с чем нарушается осмотический баланс между матриксом и межмембранным пространством митохондрий. При этом выравнивается содержание ионов в данных компартментах, рассеивается градиент H^+ на внутренней мембране, разобщается окислительное фосфорилирование [181]. Показано, что инициировать открытие неселективных каналов могут высокие концентрации Ca^{2+} , белок Вах и оксиданты [441]. Блокируют поры ингибиторы АНТ-протеина циклоспорин, бондрениевая кислота [436] и белок Vcl-2 [165]. Благодаря появлению неселективных пор в митохондриальной мембране происходит выход в цитозоль апоптоз-индуцирующих факторов [68].

Таким образом, многочисленные данные литературы свидетельствуют о целесообразности оценки трансмембранного потенциала митохондрий для получения характеристики соответствующего пути запуска летальной программы клеток.

В собственном исследовании для определения количества мононуклеарных лейкоцитов со сниженным уровнем потенциала митохондриальных мембран $\Delta\psi$ использовали набор «MitoScreen» («BD Pharmigen», США). В основе метода лежит способность флюорохрома JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлора-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазол карбо-цианин иодид) проникать через митохондриальную мембрану клетки, формируя JC-1-агрегаты. Последние обладают способностью к красному спектральному свечению ($\lambda = 590$ нм), регистрируемому на FL2-канале проточного цитометра (рис. 6).

Деполаризация митохондриальной мембраны при запуске программы апоптоза препятствует накоплению данных агрегатов внутри митохондрий. JC-1 находится в цитоплазме в виде мономеров, которые характеризуются свечением в зеленой области спектра ($\lambda = 525$ нм), измеряемым на FL1-канале.

Согласно инструкции фирмы-производителя готовили раствор JC-1, добавляя его в количестве 0,5 мл к 1 мл суспензии мононуклеарных лейкоцитов (10^6 клеток), осажденных центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин. Далее клетки ресуспендировали и инкубировали 10–15 мин при температуре 37 °С, после чего дважды отмывали буфером. Полученные образцы анализировали на проточном цитометре «Epic^{XL}» («Beckman Coulter», Франция), определяя относительное содержание мононуклеарных лейкоцитов с нормальным значением $\Delta\psi$, характеризующихся как FL2-, так и FL1-свечением, и процент клеток со сниженным значением $\Delta\psi$, обладающих способностью к FL1-свечению.

Результаты выражали в процентах (соотношение числа мононуклеарных лейкоцитов со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом и общего числа клеток).

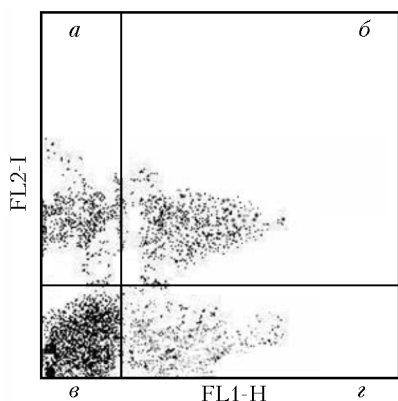


Рис. 6. Распределение мононуклеарных лейкоцитов с различным потенциалом митохондриальных мембран на двухцветной гистограмме: FL1-H – интенсивность зеленой флюоресценции (клетки, содержащие флюорохром JC-1-мономер); FL2-I – интенсивность оранжевой флюоресценции (клетки, содержащие агрегаты JC-1). Квадранты: *a* – мононуклеарные лейкоциты с интактными митохондриями; *б* – жизнеспособные мононуклеарные лейкоциты; *в* – неокрашенные клетки; *г* – мононуклеарные лейкоциты со сниженным уровнем митохондриального трансмембранного потенциала.

Оценка количества клеток со сниженным значением митохондриального трансмембранного потенциала при их культивировании в присутствии H_2O_2 в диапазоне концентраций от 10 до 500 мкмоль не выявила достоверных отличий от контрольных значений (см. табл. 2). Известно, что митохондрии концентрируют в себе большую часть окислительных метаболических путей и содержат многочисленные редокс-переносчики и центры, способные к одноэлектронному восстановлению кислорода до радикала супероксид-аниона – предшественника других АФК. Предотвращение генерации АФК, неизбежно возникающей при поступлении кислорода в клетку, обеспечивается системами антиоксидантной защиты митохондрий. Полученные оригинальные результаты, демонстрирующие отсутствие изменений $\Delta\psi$ при малых концентрациях перекиси водорода, согласуются с приведенными выше данными о низком уровне внутриклеточных АФК при соответствующем воздействии H_2O_2 . Объяснением этому может служить наличие в интактных митохондриях мощных систем удаления АФК (α -токоферол, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза), достаточных для успешного противодействия высокой скорости их генерации [470]. Кроме того, установлено, что в пермеабилizированных митохондриях из-за потери низкомолекулярных матриксных компонентов (главным образом глутатионсодержащих ферментов) развивается повышенная генерация АФК [3]. Таким образом, собственные результаты исследования подтверждают приведенные данные литературы.

Следует отметить, что при добавлении малых (10–500 мкмоль) концентраций перекиси водорода в культуру мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, наряду с отсутствием измене-

ний митохондриального трансмембранного потенциала число аннексин-положительных мононуклеаров также не изменялось (см. табл. 2). Приведенные данные могут служить подтверждением гипотезы J.J. Lemasters и соавт. [205] о том, что уменьшение $\Delta\psi$ в результате повышения проницаемости наружной митохондриальной мембраны является критическим фактором для развития апоптоза.

Относительное содержание мононуклеарных лейкоцитов со сниженным значением потенциала митохондриальных мембран возрастало при добавлении в культуральную среду H_2O_2 в конечной концентрации 1 ммоль, что статистически отличалось от соответствующего показателя в контроле ($p < 0,05$) (см. табл. 2).

Таким образом, нарушение апоптоза мононуклеарных лейкоцитов при их инкубации с перекисью водорода сопряжено с возрастанием уровня продукции внутриклеточных активных форм кислорода и падением трансмембранного потенциала митохондрий. Предположение об индукции апоптоза по митохондриальному пути в условиях окислительного стресса подтверждалось наличием положительной корреляции между увеличением числа апоптотически измененных клеток и возрастанием количества мононуклеарных лейкоцитов со сниженным $\Delta\psi$ при окислительном стрессе *in vitro* ($r = 0,78$; $p < 0,05$). Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что в условиях усиленной внутриклеточной продукции АФК передача сигнала апоптоза сопряжена с дисфункцией митохондрий, выражающейся в повышении проницаемости их мембран и снижении $\Delta\psi$.

Другим важнейшим путем запуска программы апоптоза, реализуемым в условиях окислительного стресса, является рецепторный [97]. Его наиболее распространенный вариант — индукция летальной программы клеток с помощью суперсемейства TNF-рецепторов [122]. Данное семейство включает Fas (C95, APO-1), TNF-R1, DR3/WS1-1, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2 и DR6, «домены смерти» которых находятся в цитоплазматическом участке и обеспечивают активацию каспазного каскада [249]. Лиганд-рецепторное взаимодействие индуцирует ассоциацию «доменов смерти» и их взаимодействие с адаптерными протеинами. Последние способны соединяться с соответствующими участками прокаспазы-8 [446].

Анализ количества TNF-R1-положительных клеток в культуре, инкубируемой с перекисью водорода в концентрации 1 ммоль, выявил достоверное возрастание исследуемой величины по сравнению с контролем (табл. 3). Полученные данные свидетельствуют о повышенной готовности клеток к запуску апоптотической программы по рецепторному пути в условиях окислительного стресса.

Оценку числа TNF-R1(CD120)-презентирующих клеток в культуре мононуклеарных лейкоцитов в условиях окислительного стресса *in vitro* проводили с использованием метода лазерной проточной цитофлуориметрии.

Клетки отмывали фосфатно-солевым буфером (pH = 7,2), центрифугируя 5 мин при 1 500 об/мин. Окрашивание моноклональными FITC-мечеными антителами к данному рецептору («Immunotech», Франция) производили в соответствии с инструкцией фирмы-производителя в течение 30 мин. Пробы анализировали на лазерном проточном цитофлуориметре «Erics XL» («Beckman Coulter», Франция). После гейтирования определяли количество лимфоцитарных клеток, характеризующихся зеленой флуоресценцией FITC на одномерной гистограмме.

Полученные результаты выражали в процентах (отношение числа TNF-R1-положительных клеток к общему числу мононуклеарных лейкоцитов).

Таблица 3

Уровень TNF α в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови и содержание TNF-R1-презентирующих клеток у больных острыми воспалительными заболеваниями (Me (Q₁–Q₃))

| Регистрируемый показатель | Здоровые доноры | | Пациенты с острыми воспалительными заболеваниями | |
|---|----------------------|---|---|--|
| | Интактные клетки | Клетки, инкубированные с H ₂ O ₂ в концентрации 1 ммоль | Мононуклеары, полученные у пациентов с внебольничной пневмонией | Мононуклеары, полученные у больных острым аппендицитом |
| Количество TNF-R1-положительных клеток, % | 2,01 (0,91–3,04) | 9,51 (7,83–10,02) $p_1 < 0,05$ | 9,30 (8,65–10,41) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ | 8,58 (7,75–9,64) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ |
| Уровень продукции TNF α , нг/мл | 96,0 (88,0–107,0) | 105,0 (99,0–117,0) $p_1 > 0,05$ | 150,0 (139,0–166,0) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ | 169,0 (150,0–174,0) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ |

Примечание. Здесь и в табл. 4: p_1 – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров; p_2 – по сравнению с аналогичными показателями в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у здоровых доноров и инкубированных с H₂O₂ в концентрации 1 ммоль; p_3 – по сравнению с аналогичными показателями в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у больных внебольничной пневмонией.

Поскольку запуск TNF-опосредованного апоптоза обуславливается взаимодействием данного цитокина с соответствующим лигандом, представляло интерес исследование продукции клетками TNF α , запускающего внутриклеточный каскад активации каспаз. Основными продуцентами TNF α являются моноциты и макрофаги, а также лимфо-

циты, естественные киллеры и гранулоциты крови [111]. Индукторами синтеза TNF α в организме считаются бактериальный липополисахарид (ЛПС) и ряд цитокинов (IL-1, IL-2, IFN γ , GM-CSF) [115]. Для исследования содержания TNF α в супернатантах культуры мононуклеарных лейкоцитов был использован метод, основанный на применении твердофазного иммуноферментного анализа.

Концентрацию TNF α определяли в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, до и после воздействия на клетки перекисью водорода. Пробирки, содержащие суспензии мононуклеаров, встряхивали и центрифугировали в течение 10 мин при 1 500 об/мин. В собранном после этого супернатанте проводили количественное определение уровня TNF α методом твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» анализа.

Согласно инструкции фирмы-производителя тест-системы («Протеиновый контур», Россия) в предварительно промытый буфером микропланшет вносили в 6 ячеек — по 100 мкл «0 дозы» и стандартов TNF с известными концентрациями, в остальные 90 — по 200 мкл супернатантов исследуемых проб. Инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С при непрерывном встряхивании, промывали буфером (несколько циклов). Далее в каждую лунку вносили по 100 мкл раствора вторичных антител, инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч. После промывки микропланшетов буфером и дистиллированной водой в каждую ячейку добавляли по 100 мкл конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена и проводили получасовое инкубирование при температуре 37 °С. Промывали микропланшет, в каждую лунку вносили по 100 мкл раствора субстрата с красителем и через 10–15 мин — по 50 мкл стоп-реагента.

Оптическую плотность полученного окрашенного раствора, пропорциональную концентрации исследуемого вещества, определяли колориметрически на фотометре для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм. Для построения калибровочной кривой использовали среду без продуктов жизнедеятельности клеток («0 доза») и стандартные растворы с известной концентрацией.

Полученные результаты исследования выражали в нг/мл.

Оценка содержания TNF α в супернатантах культуры мононуклеарных лейкоцитов у здоровых доноров продемонстрировала, что добавление в культуральную среду перекиси водорода в концентрации 1 ммоль не приводило к выраженному увеличению продукции TNF α клетками (табл. 3). Выявленное отсутствие изменений продукции TNF α в условиях окислительного стресса может свидетельствовать о нарушении вовлеченности редокс-сигнальных систем в наработку данного цитокина.

Вместе с тем полученные результаты свидетельствуют о повышенной готовности клеток к реализации рецептор-опосредованного пути запуска апоптоза в условиях окислительного стресса *in vitro*.

Известно, что одной из мишеней АФК в клетке являются нуклеиновые кислоты. Возникающие при этом повреждения ДНК, обуславливающие активацию гена *p53*, могут приводить к запуску ядерного пути апоптоза [117]. Данные, свидетельствующие о присутствии *p53* и его вовлеченности в редокс-зависимые пути инициации апоптоза в мононуклеарных лейкоцитах, представлены в гл. 4.

Активация либо ингибирование программированной гибели клеток как ведущего механизма ограничения пролиферации клеточных популяций может лежать в основе развития ряда патологических состояний. В то же время, в качестве ведущего патогенетического фактора для большого числа заболеваний выступает окислительный стресс – универсальный механизм повреждения клеток, при котором механизмы генерации АФК однотипны. Отличительные особенности образования внутриклеточных АФК можно установить только на начальных стадиях развития болезни [42]. Острое воспаление является одним из примеров патологических процессов, характеризующихся как дисбалансом окислительного метаболизма, так и нарушениями реализации апоптоза.

Развитие воспаления сопряжено с нарушением окислительного гомеостаза (повышением в тканях уровня свободных радикалов и продуктов их окисления и (или) снижением содержания антиоксидантов). Последовательная реализация всех стадий воспаления (альтерация, расстройство микроциркуляции с экссудацией и элиминацией, пролиферация) обуславливается действием активных метаболитов кислорода.

Повреждающее воздействие воспалительного агента нарушает структурную организацию клеточной мембраны, что сопровождается активацией процессов ПОЛ. Это универсальный ответ клеток на начальной стадии воспаления, приводящий к наработке альдегидов и кетонов в качестве конечных продуктов ПОЛ [45]. Низкомолекулярные альдегиды (2-алкенали и 4-гидроксиноненали), выявляемые в воспалительных экссудатах в микромолярных концентрациях, ингибируют продукцию O_2 нейтрофилами, фагоцитоз в моноцитах и нейтрофилах [61], а также выступают в качестве хемоаттрактантов для гранулоцитов. Основной водорастворимый продукт ПОЛ 4-гидроксиоктеналь усиливает хемотаксис гранулоцитов уже в концентрациях около 10^{-13} моль [42]. 4-Гидроксиалкенали представляют собой биологически активные альдегиды, которые образуются при неферментативном окислении жирных кислот в клеточных мембранах или липопroteинах крови. При окислении арахидоновой и линолевой кислот главным продуктом считается электрофильный 4-гидроксино-

неналь. Последний участвует в хемотаксисе гранулоцитов и определяется в воспалительных экссудатах в микромолярных концентрациях [80]. Однако более высокие концентрации альдегидов способны ингибировать хемотаксис нейтрофилов и активность фагоцитов [45], оказывая противовоспалительное действие.

Развитие окислительного стресса в очаге воспаления приводит к ингибированию супероксидом NO-радикалов. Это сопровождается усилением агрегации тромбоцитов, адгезии нейтрофилов к эндотелиоцитам и вазоконстрикцией. Активация процессов ПОЛ вызывает необратимое повреждение мембранных структур и окисление SH-содержащих белков (таких как Ca²⁺-АТФ-аза), т.е. изменение ионной проницаемости [22]. Показано, что подобные нарушения усиливают гемолиз эритроцитов и изменяют их реологические свойства [40, 304]. Кроме того, АФК вызывают окислительную (цитотоксическую) модификацию липопротеинов низкой плотности плазмы крови, облегчающую их захват макрофагами [65].

Усиление процессов свободнорадикального окисления приводит к повреждению клеток с высвобождением лизосомальных ферментов и АФК. Их воздействие на ткани в очаге воспаления рассматривается как стадия вторичной альтерации. Последняя характеризуется активацией индуцибельной NO-синтазы макрофагов, гранулоцитов и в ряде случаев эндотелиоцитов. Высокие концентрации NO-радикалов вызывают вазодилатацию, снижают адгезию и хемотаксис гранулоцитов, ингибируют пролиферацию лимфоцитов и гладкомышечных клеток, модулируют синтез ряда гормонов [16, 33]. Установлено, что свободные NO-радикалы способны индуцировать апоптоз макрофагов и гранулоцитов [334]. Блокирование летальной программы последних может осуществляться активированными эндотелиоцитами (предположительно за счет гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ)). Их защита от гибельноиндуцирующих воздействий, в свою очередь, обеспечивается гепаринсвязывающим фактором активированных нейтрофилов. Ингибирование апоптоза в данной ситуации является механизмом защиты организма от повреждающих воздействий. Вместе с тем длительное блокирование программы клеточной гибели обуславливает развитие хронического воспаления.

Стадия экссудации, связанная с развитием отека, сопровождается модулируемой цитокинами генерацией АФК. Увеличение продукции свободных радикалов обеспечивается провоспалительными (Г-КСФ, ГМ-КСФ, TNF α , IFN γ , IL-1, -2, -6, -8, фактор активации тромбоцитов), а снижение – противовоспалительными цитокинами (ространсформирующими факторами, IL-4, -10, -13).

Защитная функция воспаления связана с цитотоксическим и микробицидным действием ряда токсических соединений, большую долю которых занимают АФК. Показано, что синтез АФК в гранулоцитах осуществляется НАДФН-оксидазой и миелопероксидазой. Сами клетки удаляются из очага воспаления с помощью апоптоза, которому предшествует увеличение наработки АФК и развитие окислительного стресса. Недостаточность НАДФН-оксидазной системы, т.е. снижение синтеза АФК (в частности, в нейтрофилах у больных гранулематозом) является антиапоптогенным фактором. Активность НАДФН-оксидазы обуславливает спонтанную и Fas-индуцированную гибель нейтрофилов [61, 290]. Метаболическая активность фагоцитов связана с состоянием внутренней среды организма. Показано, что повышенное содержание в крови урата (при подагре) и глюкозы (при сахарном диабете) увеличивает наработку АФК полиморфно-ядерными лейкоцитами и способствует развитию окислительного стресса в очаге воспаления [16, 45].

Дисбаланс окислительного метаболизма при воспалении индуцирует запуск летальной программы иммуноцитов, изменяя соотношение Т-хелперов и Т-супрессоров [304], обуславливающее антигенную стимуляцию В-лимфоцитов. При этом в Т-лимфоцитах уменьшается содержание каталазы, Mn-супероксиддисмутазы, тиоредоксина и повышается чувствительность данных клеток к воздействию перекиси водорода и TNF [45, 155]. Данные изменения свойств иммунокомпетентных клеток приводят к ослаблению иммунного ответа.

Таким образом, при воспалении усиление процессов свободно-радикального окисления сопровождается увеличением наработки АФК, играющих важную роль в регуляции редокс-чувствительных сигнальных систем клетки, экспрессии воспалительных медиаторов, программ выживания или гибели клетки.

Излишняя активация апоптотической гибели клеток может приводить к истощению защитных сил организма, в то время как ее ингибирование – к хронизации воспалительного процесса. Основные эффекторные молекулы воспалительной реакции – АФК, обеспечивая микробицидное, фунгицидное и цитотоксическое действие, могут изменять жизнедеятельность всех клеток организма. В связи с этим в проведенном оригинальном исследовании влияние дисбаланса окислительного метаболизма на программированную гибель мононуклеарных лейкоцитов оценивали на модели острого воспаления (внебольничная пневмония и острый аппендицит).

Для того чтобы подтвердить факт дисбаланса окислительного метаболизма мононуклеарных лейкоцитов у больных с острым воспалени-

ем, оценивали уровень внутриклеточной АФК-продукции данными клетками. Исследование содержания АФК в мононуклеарных лейкоцитах, выделенных из крови у пациентов с внебольничной пневмонией, показало, что данный параметр достоверно превышал аналогичные величины в интактной культуре клеток крови у здоровых доноров (табл. 4). Содержание АФК в мононуклеарных лейкоцитах у больных острым аппендицитом также значимо отличалось от контрольных значений.

Т а б л и ц а 4

Внутриклеточное содержание активных форм кислорода, количество мононуклеарных лейкоцитов со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий и апоптотически измененных клеток у больных острыми воспалительными заболеваниями ($Me (Q_1-Q_3)$)

| Регистрируемый показатель | Здоровые доноры | | Больные острыми воспалительными заболеваниями | |
|---|---------------------|--|---|---|
| | Интактные клетки | Клетки, инкубированные с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль | Клетки, полученные у пациентов с внебольничной пневмонией | Клетки, полученные у больных острым аппендицитом |
| Уровень АФК в клетке, усл. ед. | 0,24 (0,19–0,33) | 0,61 (0,54–0,68) $p_1 < 0,05$ | 0,50 (0,49–0,56) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ | 0,48 (0,46–0,49) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ |
| Количество аннексинположительных клеток, % | 1,36 (0,99–2,15) | 13,11 (12,17–15,13) $p_1 < 0,05$ | 9,98 (8,79–11,33) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ | 10,46 (9,83–10,94) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ |
| Количество клеток со сниженным $\Delta\psi$, % | 1,35 (1,10–1,65) | 9,21 (6,17–12,55) $p_1 < 0,05$ | 7,52 (6,99–8,13) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ | 7,46 (6,71–7,77) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ |

Действительно, воспалительный процесс в тканях характеризуется усиленной генерацией АФК и, в первую очередь, перекиси водорода. Данный процесс обеспечивается фагоцитами — гранулоцитами, моноцитами и тканевыми макрофагами [51]. При этом 80% генерируемой в очаге воспаления H_2O_2 образуется в реакции дисмутации O_2^- супероксид-дисмутазой [317]. По данным Н.К. Зенкова и соавт. [45], суспензия из $3 \cdot 10^5$ нейтрофилов в 1 мл продуцирует H_2O_2 в концентрации

15 мкмоль, между тем их количество в очаге воспаления значительно больше. Так, в воспаленных криптах толстой кишки содержится более $2,6 \cdot 10^7$ нейтрофилов в 1 мл. Воздействие ЛПС и провоспалительных цитокинов на клетки фагоцитарного ряда уже через несколько секунд приводит к возникновению «респираторного взрыва» [63]. Клетки-защитники на фоне увеличения потребности в кислороде быстро поглощают большое его количество. Он используется для образования АФК с участием расположенной в плазматической мембране НАДФН-оксидазы. В основе «дыхательного взрыва» лежит резкое повышение образования НАДФН в клетке в результате активации гексозомонофосфатного шунта и окисления НАДФН ферментным комплексом – НАДФН-оксидазой с формированием супероксиданион радикала [54]. Фагоциты образуют супероксидный анион-радикал, что способствует дальнейшей генерации перекиси водорода и гидроксил-радикала [56].

В качестве источника перекиси водорода также выступают ферментативные реакции с оксидазами (ксантинооксидаза, оксидазы L-аминокислот), которые переносят два электрона на молекулу кислорода, и реакция дисмутации, катализируемая СОД [92, 95]. Образованная при «дыхательном взрыве» перекись водорода, проникая в соседние клетки, индуцирует в них усиление АФК-продукции за счет разобщения окислительного фосфорилирования. Распространяясь подобным образом на значительные расстояния, H_2O_2 приводит к изменениям структуры и функции клеток крови в отсутствие прямых межклеточных контактов. Данный механизм, по всей видимости, может лежать в основе зарегистрированного в собственных исследованиях увеличения продукции АФК в мононуклеарных лейкоцитах крови у больных острыми воспалительными заболеваниями.

Выявленное отсутствие различий содержания АФК в клетках, выделенных из крови у больных острым аппендицитом и внебольничной пневмонией, соотносится с положением, что острое воспаление является типовым патологическим процессом. Сравнительный анализ содержания АФК в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, при их инкубации с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль и у больных с острым воспалительным процессом показал, что степень возрастания данного показателя была более выражена при экспериментальном моделировании окислительного стресса ($p < 0,05$) (табл. 4).

Помимо окислительного стресса, апоптоз, как это показано выше, также относится к типовым универсальным механизмам регуляции клеточного гомеостаза, лежащим в основе развития большого

числа распространенных заболеваний, в том числе воспалительных процессов.

Оценка выраженности апоптоза в культуре мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови у пациентов с внебольничной пневмонией, показала увеличение данного показателя по сравнению с контролем (см. табл. 4). Количество апоптотически измененных мононуклеарных лейкоцитов, полученных у больных острым аппендицитом, также достоверно превышало их содержание в норме.

Отсутствие различий показателей апоптотической активности мононуклеарных лейкоцитов, определенных с использованием лазерной проточной цитофлюориметрии и TUNEL-метода (11,50 (10,00–13,00)%, $p > 0,05$) (рис. 7), подтверждает адекватность примененного аннексинового теста для характеристики реализации летальной программы клеток.

Для подтверждения наличия в исследуемой культуре клеток с апоптотическими изменениями, определяемыми в аннексиновом тесте, применяли TUNEL-метод («Webstain», США). Метод основан на способности фермента TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) специфически распознавать 3'-ОН-конец хромосомного разрыва и присоединять к нему светящийся зонд.

Каплю суспензии мононуклеарных лейкоцитов, отмытых в ФСБ, наносили на предметное полилизированное стекло, высушивали в течение 3–4 ч при температуре 4 °С. Фиксацию препарата осуществляли в течение 10 мин в парах 10%-го раствора формалина (рН = 7,4) при комнатной температуре, затем помещали (во избежание высыхания) во влажную чашку Петри. На извлекаемый из камеры препарат наносили 500 мкл ФСБ и инкубировали 30 мин при температуре 37 °С. Затем буфер сливали, с целью пермеабиллизации мембраны клеток на образец помещали 250 мкл раствора протеиназы К. Инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С. Далее проводили 4-кратное промывание препарата, каждый раз помещая 500 мкл дистиллированной воды на предметное стекло и выдерживая 2 мин. После удаления воды наносили на 5–10 мин раствор TdT-буфера, сливали и наносили 50 мкл TdT-раствора (TdT-буфер, FITC-метка, TdT-фермент), выдерживали 60 мин при комнатной температуре. Затем TdT раствор удаляли, препарат помещали в ТВ раствор (входит в состав набора реагентов) на 15 мин при температуре 37 °С, затем промывали 4 раза в дистиллированной воде. Флюоресцентное микроскопирование образцов проводили в течение 10 мин после их приготовления. Полученные данные переводили в проценты (соотношение числа флюоресцирующих клеток и общего числа мононуклеарных лейкоцитов).

Относительное содержание апоптотических клеток в культурах мононуклеарных лейкоцитов у больных острым воспалением (внебольничная пневмония и острый аппендицит) оказалось достоверно ниже их количества при окислительном стрессе *in vitro* (см. табл. 4).

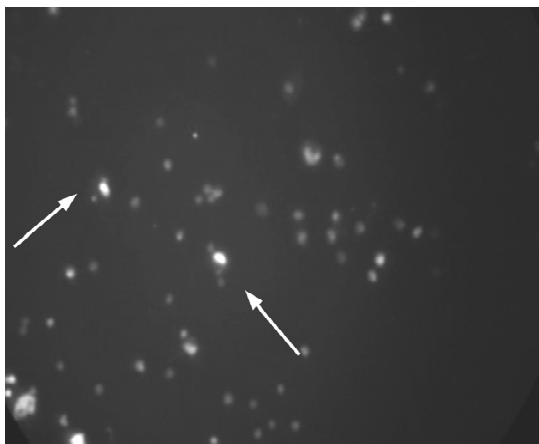


Рис. 7. Апоптотические мононуклеарные лейкоциты крови у больных острым аппендицитом (по данным TUNEL-метода)

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что острое воспаление характеризуется нарушением редокс-гомеостаза и сопровождается активацией процессов апоптотической гибели мононуклеарных лейкоцитов крови. Выявлено наличие положительной корреляции между повышением уровня АФК и возрастанием количества апоптотически измененных мононуклеарных лейкоцитов при острых воспалительных заболеваниях ($r = 0,71$; $p < 0,05$).

В эксперименте показано, что распространение апоптотического сигнала между клетками может происходить с участием АФК (в частности, перекиси водорода) [100, 317]. При воспалении гибель клеток, окружающих очаг инфекции, способствует образованию непроницаемого для бактерий и токсинов барьера, защищающего организм от поражения. Передача апоптотического сигнала с помощью перекиси водорода может происходить быстро и на значительные расстояния, опережая распространение инфекции [83]. Распространение иницирующих апоптоз сигналов с помощью АФК (в отсутствие прямых межклеточных контактов) играет важнейшую роль в физиологических и патологических процессах [462]. Как было отмечено выше, одним из редокс-чувствительных элементов клетки является митохондрия, повышение проницаемости наружной мембраны которой сопровождается выходом в цитозоль апоптогенных факторов. Данный механизм лежит в основе митохондриального пути запуска апоптоза, оцененного у пациентов с острым воспалением путем регистрации клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий.

Исследование содержания мононуклеарных лейкоцитов со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий в культуре клеток у больных внебольничной пневмонией, проведенное методом лазерной проточной цитофлуориметрии, показало достоверное возрастание соответствующего показателя относительно контроля. Оценка количества клеток со сниженным $\Delta\psi$ в мононуклеарных лейкоцитах крови у больных острым аппендицитом продемонстрировала, что величина данного показателя достоверно превышала таковую в культуре клеток у здоровых доноров (см. табл. 4).

Сравнительный анализ содержания клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом в культуре мононуклеарных лейкоцитов у здоровых доноров при экспериментальном окислительном стрессе (добавление перекиси водорода в концентрации 1 ммоль в культуральную среду) и в случае внебольничной пневмонии и острого аппендицита показал отсутствие достоверных различий между данными величинами.

Таким образом, нарушения баланса окислительного метаболизма мононуклеарных лейкоцитов как в случае индукции окислительного стресса перекисью водорода, так и при остром воспалении (внебольничная пневмония и острый аппендицит) сопровождаются возрастанием числа клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий.

Вызвало интерес состояние не только митохондриального, но и рецепторного (TNF-R1-опосредованного) пути инициации летальной программы клеток при остром воспалении. Оценка относительного содержания TNF-R1-положительных клеток в культуре мононуклеарных лейкоцитов, полученных у больных пневмонией, выявила достоверное увеличение их количества по сравнению с контролем. Количество TNF-R1-презентирующих клеток в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови у больных острым аппендицитом не отличалось от такового в культуре клеток больных пневмонией, но в то же время достоверно превышало контрольные значения (см. табл. 3).

Изучение способности мононуклеарных лейкоцитов презентировать на плазматической мембране TNF-R1 в присутствии перекиси водорода в концентрации 1 ммоль продемонстрировало отсутствие различий между данной величиной и аналогичными показателями у больных внебольничной пневмонией и острым аппендицитом (см. табл. 3).

Таким образом, индуцируемый добавлением в культуральную среду перекиси водорода окислительный стресс и острый воспалительный процесс сопровождаются повышением готовности клеток к реализации TNF-опосредованного программированного механизма

летальной программы клеток. Подтверждением этому служат результаты проведенной оценки продукции TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови при остром воспалении. Исследование значений данного показателя в супернатантах культуры клеток, полученных у пациентов с внебольничной пневмонией, продемонстрировало возрастание тестируемой величины относительно контроля. Содержание TNF α в супернатантах мононуклеарных лейкоцитов у больных острым аппендицитом превышало соответствующую величину в интактной культуре клеток, полученных у здоровых доноров (см. табл. 3). Кроме того, уровень продукции TNF α мононуклеарными лейкоцитами, полученными у больных острыми воспалительными заболеваниями, достоверно превышал соответствующую величину при окислительном стрессе *in vitro* ($p < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о нарушении TNF-опосредованного пути запуска апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови при дисбалансе окислительного метаболизма как в условиях эксперимента, так и в клинике острого воспаления.

Результаты исследования, характеризующие степень участия ядерного пути запуска апоптоза мононуклеарных лейкоцитов в его активации у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями, подробно рассмотрены в гл. 4, однако, несколько забегаая вперед, следует констатировать факт активации ядерного пути запуска апоптоза при окислительном стрессе (в случае эксперимента и при остром воспалении).

Проанализировав данные, характеризующие особенности реализации апоптоза при окислительном стрессе, полученные на первом этапе настоящего исследования, можно утверждать, что возрастание уровня АФК в мононуклеарных лейкоцитах крови сопряжено с активацией митохондриального и ядерного вариантов запуска апоптотической гибели, а также с повышенной готовностью инициации рецепторного пути (рис. 8).

Следующий этап исследования был посвящен установлению молекулярных редокс-чувствительных механизмов данного явления, позволяющему идентифицировать молекулярные мишени для коррекции нарушений апоптоза при окислительном стрессе.

В настоящее время обнаружено большое число сигнальных путей, регулируемых АФК. Среди них в наибольшей степени изучены механизмы, основанные на фосфорилировании и дефосфорилировании белков специфическими киназами и фосфатазами [74]. В частности, универсальными трансмиттерами сигналов от множества трансмембранных рецепторов к внутриклеточным компартаментам выступают

МАР-киназы. К числу последних относятся митогенактивируемые протеинкиназы JNK и p38, фосфорилирующие ответственные за реализацию летальной программы клетки белки-мишени, среди которых важное место занимают факторы транскрипции NF-κB и p53 [248].

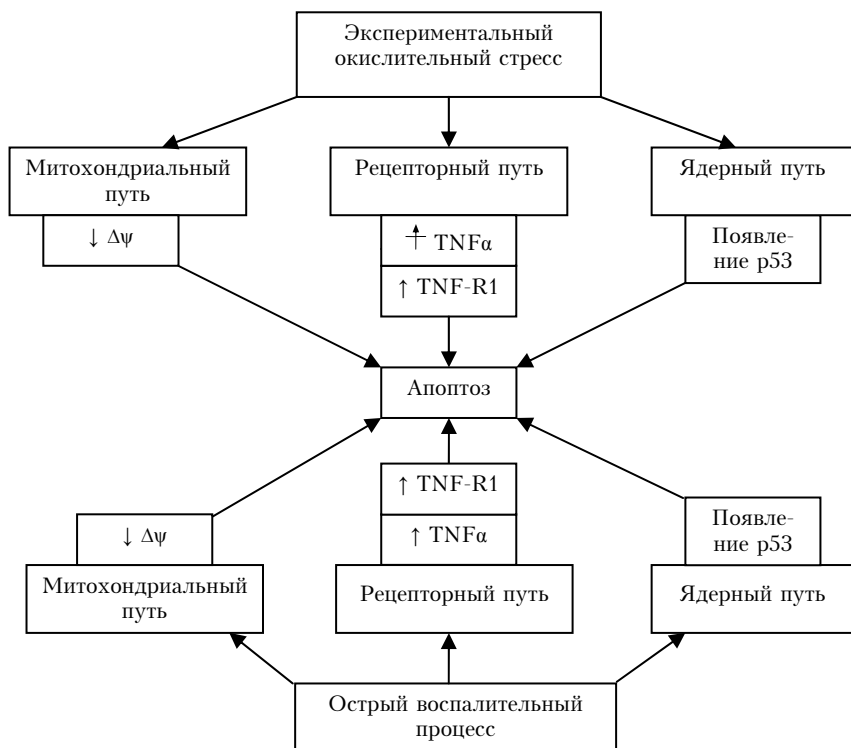


Рис. 8. Состояние путей инициации апоптоза при окислительном стрессе (по результатам собственных исследований): ↓ – уменьшается; † – остается постоянным; ↑ – увеличивается

Активируемые киназами NF-κB и p53, в свою очередь, контролируют синтез ключевых белков-регуляторов апоптоза. Выбор про- или анти-апоптогенной функции данными элементами сигнальной трансдукции зависит от особенностей иницирующих сигналов, комбинацией возможных путей их передачи и типов клеток. Изучению роли редокс-чувствительных сигнальных молекул в реализации летальной программы клеток при окислительном стрессе посвящены следующие главы монографии.

Глава 3

РОЛЬ MAP-КИНАЗ В РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Воздействия на клетку цитокинов, гормонов, факторов роста и других обуславливают активацию определенных элементов системы сигнальной трансдукции [34]. Ее важнейшими элементами являются протеинкиназы, активирующие друг друга по каскадному принципу (рис. 9). Особая роль в реализации клеточного ответа принадлежит редокс-чувствительным MAP (Mitogen-activated protein) киназам. Данные киназы представлены тремя семействами: p38 (протеинкиназа 38 кДа), JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/Stress activated protein kinase) и ERK (Extracellular signal-regulated kinase). Последние ответственны за выживание и пролиферацию клеток, в то время как активация киназ семейств p38 и JNK/SAPK связана с инициацией апоптоза [24, 87, 248, 357].

Протеинкиназы JNK и p38 фосфорилируют проапоптотические белки-мишени, связанные с регуляцией программированной клеточной гибели и функционированием соответствующих факторов транскрипции [25]. Вместе с тем ряд исследований свидетельствуют о наличии антиапоптотической активности JNK и p38, зависящей от особенностей индуцирующих сигналов, комбинаций возможных путей их передачи и типов клеток [139, 337, 367, 471]. В связи с этим возникает необходимость более подробного изучения роли стресс-активируемых протеинкиназ JNK и p38 в реализации летальной программы клеток при окислительном стрессе.

Показано, что различные стрессовые воздействия (ультрафиолетовое излучение, АФК, ингибиторы синтеза белка, цитокины и др.) способны активировать MAP-киназы [109, 118, 168, 248, 295, 458] через активацию белков, запускающих соответствующие сигнальные каскады (так, ASK1 активирует p38 и JNK) [265].

Внутри каждого трехкомпонентного протеинкиназного каскада MAP-киназы (МАРК) фосфорилируются и активируются протеинкиназами МКК (МАРК Kinase)/МАРКК двойной специфичности (по тирозину и треонину). Последние автофосфорилируются серин-треониновыми киназами МККК (МАРК Kinase Kinase)/МАРККК [250].

Выделяют также дополнительный уровень данной сигнальной системы – малые ГТФ-азы (Ras, Rac, Rho, Cdc42) и протеинкиназы МКККК (МАРК Kinase Kinase Kinase)/МАРКККК. Они регулируют активность МККК и реализуют специфичную передачу сигнала на трехкомпонентный протеинкиназный каскад [118, 336].

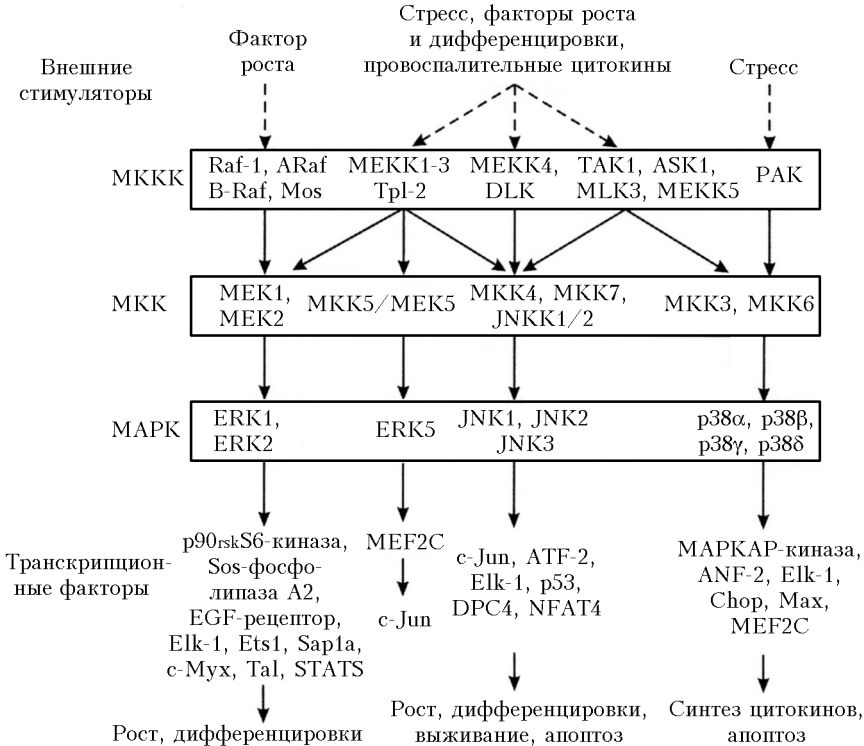


Рис. 9. Схема митогенактивируемых протеинкиназных каскадов (по данным Т.Р. Garrington, G.L. Johnson, 1999)

В зависимости от особенностей регуляции МАРК-киназы подразделяются на несколько групп: ERK1/2, p38 (p38 α / β / γ / δ), JNK1/2/3 и ERK5. Для каждой из них существует высокоспецифичная МКК, обеспечивающая минимум МАРК–МКК взаимодействий: MEK1/2 для ERK1/2; MKK3/6 – для p38; MKK4/7 (JNK1/2) – для JNK [87], MEK5 – для ERK5 (рис. 9). Активация МКК комбинацией протеинкиназ МКККК обеспечивает разнообразие путей передачи внутриклеточного сигнала. При этом соблюдается специфичность взаимодействий для различных стимулов, действующих на клетку.

МККК (в отличие от МК и МАРК) характеризуются наличием следующих регуляторных мотивов: домен PH (Pleckstrin homology), последовательность для связывания SH3 (Srs Homology-3) домена, сайт связывания для малых ГТФ-аз, лейциновая молния – последовательность, позволяющая белкам димеризоваться, сайты фосфорилирования Tug и Ser/Thr протеинкиназами [118, 250].

Благодаря этому МККК могут участвовать более чем в одном сигнальном пути и способны по-разному регулироваться многочисленными сочетаниями сигнальных молекул в зависимости от действующего стимула.

Большое количество сайтов белок-белковых взаимодействий позволяет МККК активировать МАР-киназы, минуя промежуточную ступень каскада. Так, воздействие на эмбриональные стволовые клетки TNF и IL-1 вызывает МЕКК1-индуцированную активацию JNK [34, 208, 336]. Ультрафиолетовое излучение и присутствие ингибиторов синтеза белка, напротив, не вызывают взаимодействия МЕКК1 и JNK. Таким образом, представленные данные являются подтверждением специфичности МАР-киназной активации уже на уровне МККК.

Непересекаемость протеинкиназных сигнальных путей в клетке обеспечивается адаптерными скэффолд-белками, такими как JIP-1 (JNK interacting protein 1), MP (MEK partner), JLP и JSAP1 [87, 300, 382]. Они фосфорилируют мультиферментные комплексы с протеинкиназами, разделяющие различные каскады и участвующие в том или ином сигнальном пути [238, 382] (рис. 10). Так, скэффолд-белок JIP связывает MLK3, МКК7 и JNK: MLK3 фосфорилирует МКК7, который активирует JNK. Белок JIP является ингибитором киназы JNK, так как повышение его экспрессии сопровождается накоплением в цитоплазме и блокированием активации JNK в ответ на такие стрессовые воздействия, как ультрафиолетовое облучение и присутствие ингибитора синтеза белка. В то же время экспрессия JIP с MLK3 или МКК7 усиливает их активирующее влияние на JNK [34, 300, 408].

Множество работ указывают на участие JNK и p38 в различных стрессовых реакциях, однако универсальный путь активации данных киназ не выявлен [65, 109, 239].

Ответ клетки на различные стимулы реализуется в изменении экспрессии определенных генов. При этом МАР-киназные сигнальные системы опосредуют свое действие через разные транскрипционные факторы: c-jun, ATF2, Elk-1, p53, NFAT, c-Myc и др. Их активация обусловлена фосфорилированием МАР-киназами связанных с ДНК белков. Поскольку большинство таких транскрипционных фак-

торов являются димерами, некоторые из MAP-киназ также димеризуются при активации, что позволяет усиливать эффект фосфорилирования [155, 214, 250, 336].

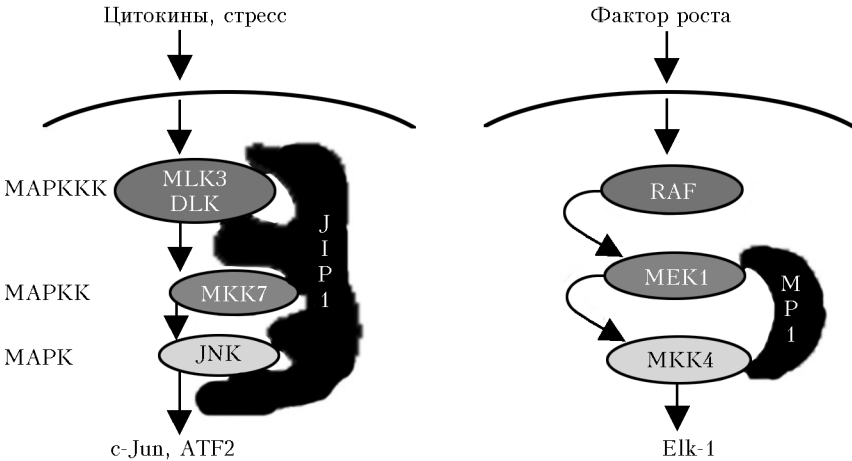


Рис. 10. Участие структурных белков (скэффолда) в MAP-киназном каскаде (по данным E. Elion, 1998)

Большинство MAP-киназ активируют транскрипционные факторы семейства Ets, вовлеченные в индукцию генов *fos*. Белковые продукты последних гетеродимеризуются с факторами семейства Jun, фосфорилируемые JNK [118, 250, 263, 408]. В результате образуются активационные белковые комплексы AP-1, регулирующие транскрипцию многих генов [87, 214, 220, 418]. Показано, что p38-киназа активирует фактор NF-κB, MEF2C и другие белки данного семейства [248, 336], регулирует экспрессию моноаминоксидазы в апоптотических клетках, участвуя в стабилизации ее мРНК [217, 230].

Активированные в цитоплазме MAP-киназы лишь частично транслоцируются в ядро, где находятся транскрипционные факторы. Большая часть данных ферментов остается в цитоплазме и других клеточных компартментах. В этом случае субстратами MAP-киназ служат цитоплазматические белки, позволяющие регулировать экспрессию генов на посттрансляционном уровне. Так, мишенью JNK активированных T-лимфоцитов является эндоплазматический белок, опосредованно (через два других протеина) связывающийся с 5'-нетранслируемой областью мРНК IL-2. Это обуславливает участие JNK в стабилизации мРНК и повышении экспрессии IL-2, т.е. в

стимуляции пролиферации Т-лимфоцитов [296, 407]. Некоторые виды мРНК могут стабилизироваться в ответ на активацию p38 [208, 248, 407, 418].

МАР-киназы, активируясь в ряде случаев дополнительную протеинкиназу МАРКАР (Mitogen-activated protein kinase activated protein), участвуют в контроле процесса трансляции. Установлено, что выступающая в роли такой МАРКАР протеинкиназа MNK1 фосфорилирует фактор инициации трансляции 4е (eIF_{4e}), усиливая взаимодействие кэп-связывающего комплекса с кэпированной мРНК, благодаря чему улучшается сборка полисом [34]. Показано, что МАРКАР для ERK являются p70/p90rskS6-киназы [87, 357].

В качестве субстратов МАР-киназ выступают некоторые цитоскелетные белки — белки нейрофиламентов NF-N и NF-M [208, 250], белки микротрубочек нейронов SCG10 [304]. Предполагается вовлечение МАР-киназ в опосредованную фосфорилированием регуляцию основных белков, ассоциированных с микротрубочками, — MAP2 и MAP4 [36].

Таким образом, МАР-киназы, активируясь в ответ на различные стрессовые сигналы, играют важную роль в обеспечении ответа клетки на стрессовое воздействие через контроль экспрессии соответствующих генов. В частности, данные элементы внутриклеточной сигнальной трансдукции участвуют в реализации процесса апоптоза [122]. Последнее особенно наглядно демонстрирует участие МАР-киназ в механизмах TNF-R1-зависимой гибели. TNF-опосредованный вариант цитотоксичности, как наиболее типичный и универсальный, соответствует основным событиям в клетке, индуцируемым различными агентами биологической, химической или физической природы [76, 430] (рис. 11).

Активация тримеров TNF-R1 под влиянием TNF приводит к ассоциации доменов смерти DD данных рецепторов. В течение минуты DD TNF-R1 связывается с DD на С-концевом участке адаптерного белка TRADD. Помимо этого, TRADD может взаимодействовать с белками TRAF (рис. 12), RIP и FADD/MORT1.

Комплексы TRADD–TRAF и TRADD–RIP индуцируют активность JNK киназы и транскрипционного фактора NF-κB, что приводит к пролиферации либо апоптозу клетки в зависимости от условий. TRADD–FADD запускает каспазозависимый вариант апоптогенной программы; RIP-зависимая, как и TRAF-зависимая, активация JNK представляет собой последовательное фосфорилирование следующих элементов каскада: TRADD–RIP–МЕКК1–МЕК–JNK–AP-1 (Activator protein 1 transcription factor) [1, 76, 421].

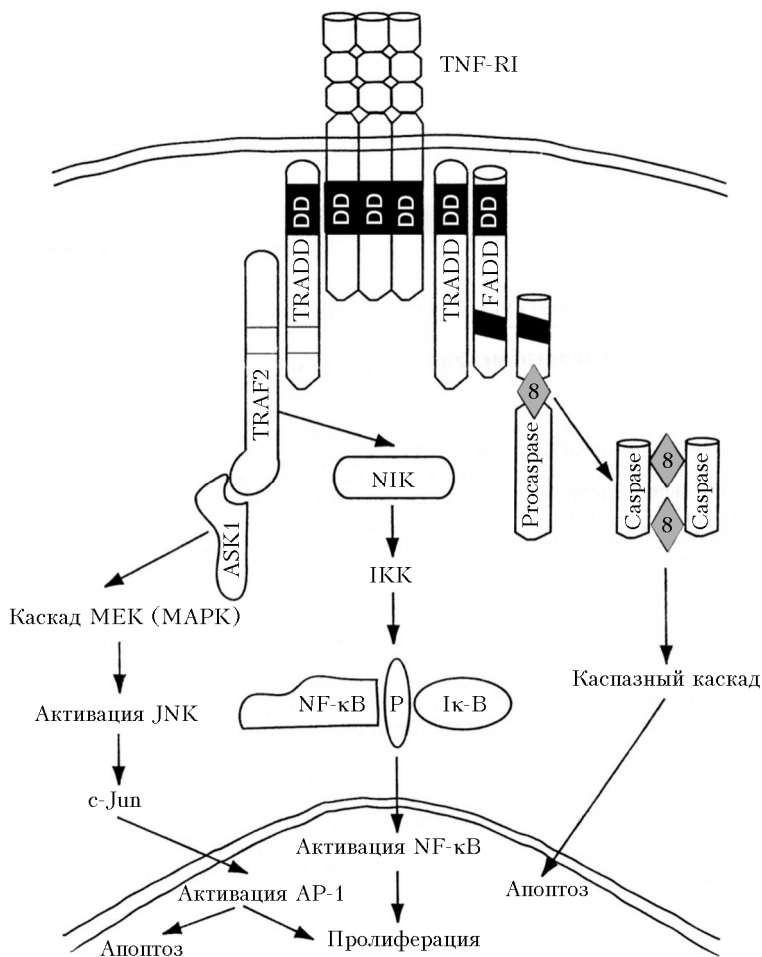


Рис. 11. Схема сигнальных путей, опосредованных TNF-R1 (по данным М.А. Пальцева, 2004)

Активация JNK играет ведущую роль в запуске летальной программы клеток в ответ на стресс (воздействие воспалительных цитокинов IL-1 и TNF α , свободных радикалов и др.) [161]. Показано, что инициация программы апоптоза H9c2 миоцитов, индуцируемая окислительным стрессом, может быть заблокирована ингибированием JNK [435]. Наиболее подвержен стрессовым воздействиям (в частности, при повреждении белков) механизм активации JNK, связанный с

ингибированием JNK-инактивирующих фосфатаз [25]. Подавление функции последних в условиях теплового шока обеспечивает продолжительную активацию JNK. Установлено, что шаперон Hsp72 защищает JNK-специфичную фосфатазу, ингибируя JNK и блокируя таким образом клеточную смерть [168]. Вместе с тем JNK может оказывать и антиапоптогенное действие: выявлена активация процессов NO-индуцированного апоптоза за счет экспрессии доминант-негативной JNK1 либо доминант-негативной МКК4 [139]. Показано предотвращение апоптоза кардиомиоцитов (в условиях ишемии) ингибированием JNK1 [279].

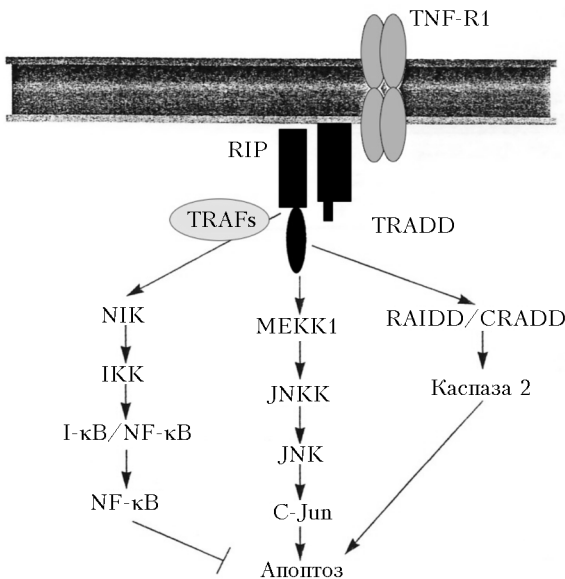


Рис. 12. Схема сигнальных путей, опосредованных комплексом TNF-R1–TRADD–RIP (по данным М.А. Пальцева, 2004)

JNK может индуцировать апоптоз путем фосфорилирования и активации фактора транскрипции p53 по Thr8 [25]. Показано, что неактивная JNK связывается с p53 на участке между 97-м и 116-м остатками, вызывая деградацию белка в протеосомах. Регулятор транскрипции с-Мус (клеточный гомолог онкогена миелоцитоматоза), фосфорилируемый JNK, также участвует в апоптозе [25].

Известно, что редокс-чувствительная киназа JNK играет важную роль в митохондриальном пути реализации апоптоза [155, 226, 405]. Установлено, что JNK-киназа может проникать в митохондрии, где фосфорилирует и активирует проапоптотические белки Вах и Вад, а

также инактивирует антиапоптотические белки семейства Bcl-2 [145, 244, 265, 405] (рис. 13). Так, Н. Aoki и соавт. показали, что активированные JNK и MKK4, локализованные в митохондриях, индуцируют высвобождение цитохрома с и усиливают апоптоз кардиомиоцитов [226]. В литературе имеются сведения о том, что JNK, независимо от каспазы-8 непосредственно активирует расщепление Bid, облегчая таким образом реализацию митохондриального пути клеточной смерти [124]. Наконец, JNK-киназа прямо фосфорилирует два дополнительных проапоптотических белка Bim и Bmf, облегчая тем самым их транслокацию в митохондрии [311].

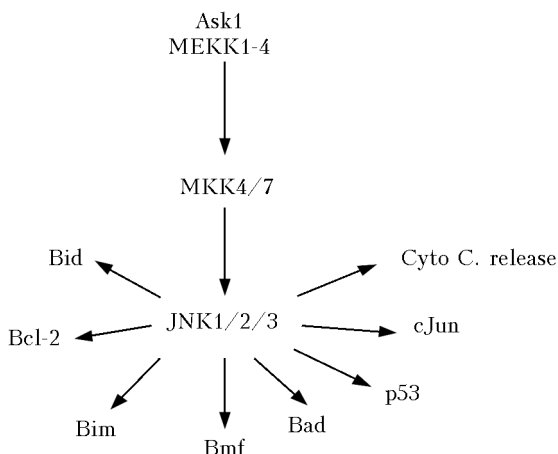


Рис. 13. Молекулярные мишени действия стрессактивируемой киназы JNK в реализации апоптоза (по данным С.Р. Baines, J.D. Molkentin, 2005)

Роль р38 в реализации запрограммированной гибели также неоднозначна. Установлено, что трансфекция MKK6 – элемента р38-киназного каскада – вызывает фосфорилирование шаперона αВ-кристаллина, усиливая антиапоптотический эффект [337, 366, 471]. По данным С. Communal и соавт., ингибирование р38 приводит к увеличению апоптотической активности кардиомиоцитов [202].

Вместе с тем результаты большого числа исследований свидетельствуют о вовлеченности р38 в индукцию летальной программы клеток. Ингибирование р38 блокирует апоптоз кардиомиоцитов, индуцированный ишемией, в культуре и *in vivo* [277, 326, 434]. Активация р38 способствует экспрессии и митохондриальной трансдукции Bax – одного из важнейших апоптогенных белков, опосредуя свое влияние через фосфорилирование р53 [302, 329] (рис. 14).

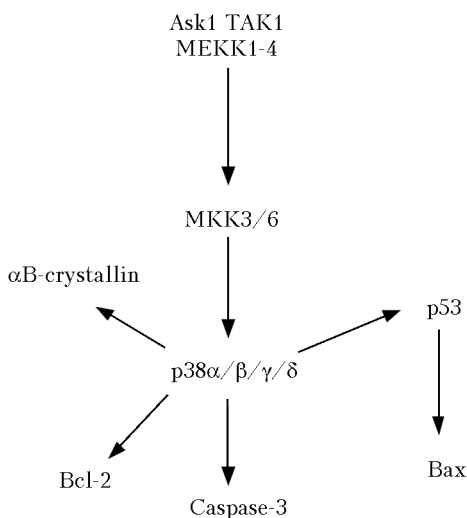


Рис. 14. Молекулярные мишени действия стрессактивируемой киназы p38 в реализации апоптоза (по данным С.Р. Vaines, J.D. Molkentin, 2005)

Установлено, что после удаления фактора роста нервов киназа p38 нейронов способна проникать в митохондрии и фосфорилировать, инактивируя таким образом антиапоптогенный Bcl-2 [347]. Киназа p38 фосфорилирует участвующие в реализации летальной программы факторы транскрипции (NF-κB, MEF2) [248, 336], а также регулирует экспрессию моноаминоксидазы в апоптотических клетках [217, 230].

Таким образом, стрессактивируемые киназы, с одной стороны, являются неотъемлемым элементом системы регуляции летальной программы, а с другой — играют ключевую роль в процессах пролиферации и дифференцировки клеток. Однако условия и факторы, способствующие проявлению апоптогенной функции MAP-киназ (в том числе окислительный стресс), требуют детального изучения.

Для выяснения роли JNK, p38 в регуляции программы апоптоза при окислительном стрессе было проведено двухэтапное исследование. На начальном этапе применялся широко распространенный подход к изучению функций MAP-киназ, основанный на оценке результатов эксперимента при их избирательном блокировании. В исследовании регистрировалась активность процесса апоптоза в культурах клеток, инкубируемых с селективными ингибиторами JNK и p38 (SP600125 и ML3403 соответственно) в присутствии H₂O₂ в концентрации 100 мкмоль либо 1 ммоль.

SP600125 (anthra (1,9-cd) pyrazol-6(2H)-one) является мощным обратимым ингибитором JNK с молекулярной массой 220,2 кДа и молекулярной формулой $C_{14}H_8N_2O$ («Biosource», США). Он хорошо проникает в клетку и является ценным инструментом для исследования роли JNK в процессах воспалительного ответа, апоптоза и клеточной пролиферации [243]. SP600125 малорастворим в водной среде, поэтому для гарантированной доставки к клеткам ингибитор растворяли в 0,1% DMSO.

Выделенные мононуклеарные лейкоциты крови культивировали в 96-луночных планшетах. В лунку вносили 50 мкл суспензии клеток ($2 \cdot 10^6$ /мл), а также полную питательную среду, состоящую из 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», г. Новосибирск), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», г. Санкт-Петербург), инактивированной при температуре 56 °С в течение 30 мин, L-глутамина в концентрации 0,3 мг/мл, гентамицина в концентрации 100 мкг/мл, HEPES в концентрации 2 ммоль/мл («Flow», Великобритания). После этого в клеточную культуру добавляли 4 мкл ингибитора JNK-SP600125 в концентрации 20 мкмоль и инкубировали 1 ч при температуре 37 °С и 5% CO_2 . После часовой инкубации клеток с ингибитором JNK в клеточные культуры мононуклеарных лейкоцитов крови вносили перекись водорода в конечной концентрации 100 мкмоль и 1 ммоль для индукции окислительного стресса. Мононуклеарные лейкоциты крови, полученные у пациентов с острым воспалением, культивировали с ингибитором SP600125 без добавления H_2O_2 . После окончания 18-часовой инкубации регистрировали апоптоз клеток с помощью аннексинового теста и готовили клеточные лизаты для оценки внутриклеточного уровня общих и фосфорилированных форм MAP-киназ, фосфо-p53, Вах, и Bcl-2 методом вестерн-блоттинга.

ML3403 (RS)-{4-[5-(4-Fluorophenyl)-2-methylsulfonyl-3H-imidazol-4-yl]pyridine-2-yl}-(1-phenylethyl)amine – мощный селективный ингибитор p38 MAPK с молекулярной массой 404,5 кДа ($C_{23}H_{21}FN_4S$) («Biosource», США). По кинетическим свойствам ML3403 хорошо проникает в клетку, является конкурентоспособным относительно АТФ.

Мононуклеарные лейкоциты крови, полученные как у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями, так и у здоровых доноров, выделяли и культивировали в соответствии с вышеописанными методиками. При культивировании мононуклеаров с ингибитором p38 MAPK в клеточные культуры добавляли 4 мкл ML3403 в концентрации 10 мкмоль. Все дальнейшие манипуляции, проводимые с H_2O_2 в концентрации 100 мкмоль и 1 ммоль в случае культивирования мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров с ингибитором JNK были аналогичными при использовании ингибитора p38 MAPK. После 18-часовой инкубации проводили регистрацию апоптоза с использованием аннексина V FITC методом проточной лазерной цитометрии, а также готовили клеточные лизаты для оценки уровня общих и фосфорилированных форм MAP-киназ, фосфорилированного p53, Вах и Bcl-2 методом вестерн-блоттинга.

Как свидетельствуют данные, представленные в гл. 2, при инкубировании мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у здоровых доноров, с H_2O_2 в концентрации 100 мкмоль и 1 ммоль статистически

значимое увеличение числа апоптотических клеток выявлялось только в случае применения перекиси водорода в концентрации 1 ммоль (табл. 5).

Таблица 5

Количество аннексинположительных клеток в общей популяции мононуклеарных лейкоцитов крови в условиях культивирования *in vitro* с перекисью водорода и селективными ингибиторами MAP-киназ JNK и p38 (Me (Q₁–Q₃))

| Условия инкубации | Содержание аннексинположительных клеток, % |
|--|---|
| Интактная культура | 1,36 (0,99–2,15) |
| Инкубирование с H ₂ O ₂ в концентрации 100 мкмоль | 1,82 (0,72–2,77) $p_1 > 0,05$ |
| Инкубирование с H ₂ O ₂ в концентрации 1 ммоль | 13,11 (12,17–15,13) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ |
| Инкубирование с H ₂ O ₂ в концентрации 100 мкмоль и ингибитором p38 ML3403 | 1,57 (0,65–2,47) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,001$ |
| Инкубирование с H ₂ O ₂ в концентрации 100 мкмоль и ингибитором JNK SP600125 | 1,48 (0,61–2,39) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,001$ $p_4 > 0,05$ |
| Инкубирование с 1 ммоль H ₂ O ₂ и ингибитором p38 ML3403 | 0,91 (0,25–2,78) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,001$ $p_4 > 0,05$ $p_5 > 0,05$ |
| Инкубирование с H ₂ O ₂ в концентрации 1 ммоль и ингибитором JNK SP600125 | 0,68 (0,33–2,12) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,001$ $p_4 > 0,05$ $p_5 > 0,05$ $p_6 > 0,05$ |

Примечание. p_1 – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы здоровых доноров; p_2 – по сравнению с аналогичными показателями в случае инкубации мононуклеарных лейкоцитов с H₂O₂ в концентрации 100 мкмоль; p_3 – в случае инкубации с H₂O₂ в концентрации 1 ммоль; p_4 – в случае инкубации с H₂O₂ в концентрации 100 мкмоль и ингибитором p38 ML3403; p_5 – в случае инкубации с H₂O₂ в концентрации 100 мкмоль и ингибитором JNK SP600125; p_6 – в случае инкубации с H₂O₂ в концентрации 1 ммоль и ингибитором p38 ML3403.

Содержание аннексинположительных мононуклеарных лейкоцитов при их культивировании с H_2O_2 в концентрации 100 мкмоль и ингибиторами SP600125 или ML3403 не отличалось от контроля (табл. 5). Напротив, исследование особенностей реализации апоптоза мононуклеарных клеток крови в условиях окислительного стресса *in vitro* при культивировании с ингибиторами MAP-киназ показало, что использование ингибитора JNK (SP600125), так же как и ингибитора p38 (ML3403), предотвращало запуск летальной программы клеток (табл. 5). При этом относительное содержание вступивших в апоптоз клеток при их инкубации с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль и ингибитором JNK SP600125 не отличалось от такового в случае применения ML3403.

Культивирование мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями (внебольничная пневмония, острый аппендицит), в присутствии SP600125 либо ML3403 характеризовалось аналогичной экспериментальному окислительному стрессу тенденцией к снижению числа апоптотически измененных клеток (рис. 15).

Так, ингибитор SP600125 снижал количество аннексинположительных клеток в культуре мононуклеарных лейкоцитов, полученных у больных острыми воспалительными заболеваниями (рис. 15). Содержание апоптотических клеток в культуре мононуклеарных лейкоцитов у пациентов с острым воспалением при культивировании *in vitro* с ML3403 было ниже такового в интактной культуре (рис. 15).

Сравнительный анализ числа аннексинположительных клеток в культурах клеток, инкубированных с ингибитором p38 ML3403, и в культурах мононуклеарных лейкоцитов, инкубированных с ингибитором JNK SP600125, не выявил каких-либо различий.

Таким образом, результаты проведенного исследования продемонстрировали, что ингибирование MAP-киназ p38 и JNK препятствует реализации запрограммированной клеточной гибели мононуклеарных лейкоцитов в условиях дисбаланса окислительного метаболизма. Полученные данные могут служить доказательством того, что в условиях окислительного стресса мононуклеарных лейкоцитов MAP-киназы JNK и p38 выступают в качестве проапоптогенных регуляторных молекул. Это предположение согласуется с приведенными в литературе сведениями о защитной роли ингибиторов p38 и JNK в случае сердечной дисфункции и апоптоза кардиомиоцитов, индуцированного ишемией [276, 280, 281]. Так, апоптоз кардиомиоцитов, индуцированный ишемией и доксорубицином в культуре, снижался при ингибировании p38 MAPK [277, 326]. V.L. Gabai и соавт. показали, что

ингибирование JNK в H9c2-миоцитах блокировало апоптоз, вызванный окислительным стрессом [435].

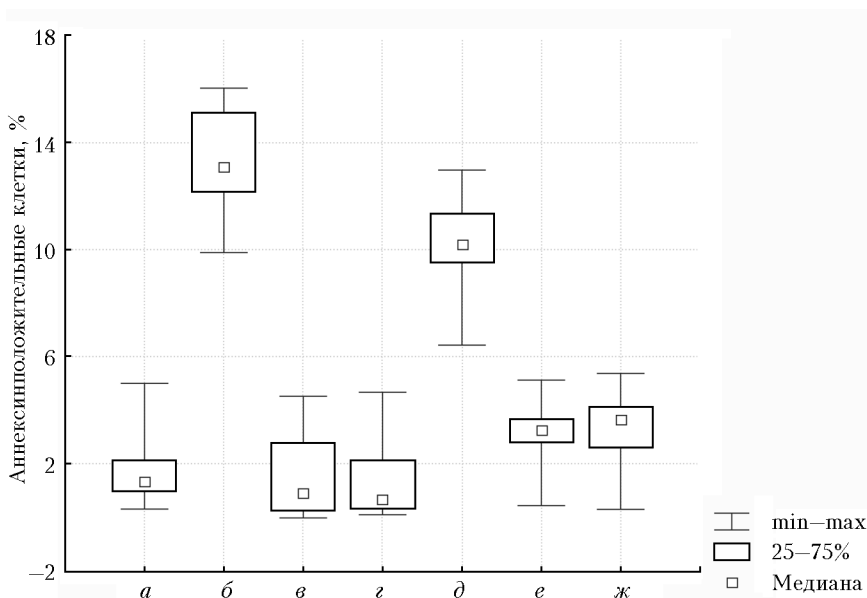


Рис. 15. Содержание апоптотических клеток в общей популяции мононуклеарных лейкоцитов крови при окислительном стрессе в условиях культивирования *in vitro* с селективными ингибиторами MAP-киназ JNK и p38: *a* – контроль; *б* – окислительный стресс *in vitro*; *в* – культивирование клеток с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль и ингибитором ML3403; *г* – культивирование с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль и ингибитором SP600125; *д* – культивирование клеток, полученных у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями; *е* – культивирование клеток, полученных у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями, в условиях *in vitro* с ML3403; *ж* – культивирование клеток, полученных у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями, в условиях *in vitro* с SP600125

При обсуждении результатов, полученных в экспериментах с ингибиторами MAP-киназ, возникают следующие вопросы: каковы молекулярные механизмы проапоптогенного эффекта MAP-киназ в условиях изменения редокс-статуса клетки; сопряжена ли данная функция JNK и p38 с увеличением содержания в мононуклеарных лейкоцитах их активных (фосфорилированных) форм, которые могут оказывать воздействие на другие мишени – элементы сигнальной системы (факторы транскрипции, белки-регуляторы апоптоза); чем может быть обусловлено это увеличение – изменением общего со-

держания киназ при окислительном стрессе за счет увеличения их экспрессии, либо только активацией процесса фосфорилирования?

Для решения этих вопросов были проведены дополнительные исследования по оценке содержания в мононуклеарных лейкоцитах общих и фосфорилированных форм JNK и p38 при окислительном стрессе методом вестерн-блоттинга. Объектом исследования являлись мононуклеарные лейкоциты, подвергшиеся воздействию перекиси водорода, и клетки, полученные у пациентов с острым аппендицитом и внебольничной пневмонией. Поскольку различий по содержанию АФК и количеству клеток, вступивших в апоптоз, в культурах мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови у пациентов с внебольничной пневмонией и острым аппендицитом, не отмечалось, эти больные были объединены в одну группу.

Для приготовления лизатов клетки осаждали центрифугированием при 1 500 тыс. об/мин в течение 5 мин и отмывали в холодном ФСБ. Затем к клеткам добавляли лизирующий буфер (Трис–НСl в концентрации 50 ммоль (рН = 6,5), дитиотреитол в концентрации 100 ммоль, 2% додецил сульфат натрия (ДСН), 0,1% бромфеноловый синий, 15% глицерол («Helikon», США), смесь протеазных ингибиторов («Sigma», США) и ФСБ). Полученную смесь перемешивали, инкубировали в течение 10 мин сначала на льду, затем при температуре 95–100 °С. Далее клеточный лизат центрифугировали при 12 000–15 000 об/мин в течение 10 мин.

Для электрофоретического разделения белков, содержащихся в полученной смеси, равные объемы лизата наносили на ДСН-ПААГ (SDS-PAGE) гель, содержащий 10% бис-акриламид и 0,1% ДСН («Helikon», США). Разделение белков по молекулярной массе проводили в электрическом поле 15 В на дорожку при силе тока 30 мА в течение 1 ч. Перенос разделенных белков на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) осуществлялся электрофоретически при силе тока 60 мА в течение 80 мин. Нитроцеллюлозные блоты инкубировали в 5% растворе обезжиренного сухого молока в ФСБ в течение 1 ч, затем – в растворе первичных антител к ключевым регуляторам апоптоза (12 ч на льду). Использовали антитела к активным и неактивным формам MAP-киназ (фосфо-JNK1, 2 и JNK1, 2 («Biosource», США), фосфо-p38 и p38 («Biosource», США)), белков (Bax («Biosource», США), Bcl-X_L («Sigma», США), Bad («Biosource», США), Bcl-2 («Biosource», США)) в разведении 1 : 200, после этого пробы дважды отмывали в ФСБ. Затем нитроцеллюлозную мембрану помещали на 1 ч в раствор вторичных антител с пероксидазной меткой («Biosource», США). Для визуализации полученных результатов применяли преципитирующий готовый субстрат к пероксидазе.

Гели и блоты сканировали. В качестве стандарта и внутреннего контроля использовали белок глицеро-3-фосфатдегидрогеназу (антитела фирмы «Chemicon», США), выражая содержание тестируемых белков в исследуемых образцах как отношение плотности их изображения к плотности изображения белка глицеро-3-фосфатдегидрогеназы [251]. Полученные результаты выражали в процентах (100% величиной считали средние значения отношений в контрольной группе).

Относительное содержание киназы p38 в мононуклеарных лейкоцитах, полученных из крови пациентов с острым воспалением (внебольничная пневмония), не отличалось от такового в контроле. Аналогичная картина обнаружена при экспериментальном окислительном стрессе *in vitro* (рис. 16).

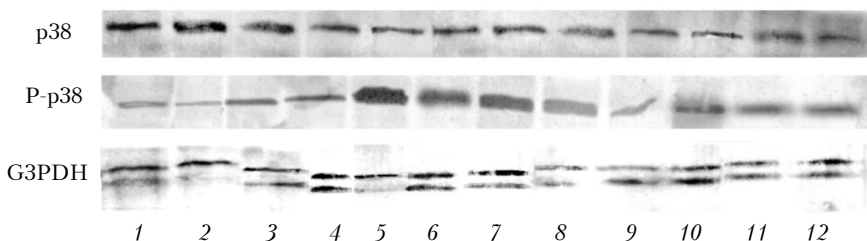


Рис. 16. Уровень общих и фосфорилированных форм MAP-киназы p38, определенный методом вестерн-блоттинга, в культурах мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров (1–4 – интактная культура; 5–8 – культура после воздействия H_2O_2 в концентрации 1 ммоль) и у пациентов с внебольничной пневмонией (9–12); G3PDH – глицеро-3-фосфатдегидрогеназа

Сравнительный анализ содержания общих форм p38 MAPK в культуре клеток здоровых доноров при инкубировании с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль и больных с острым воспалением также не выявил каких-либо отличий (рис. 17).

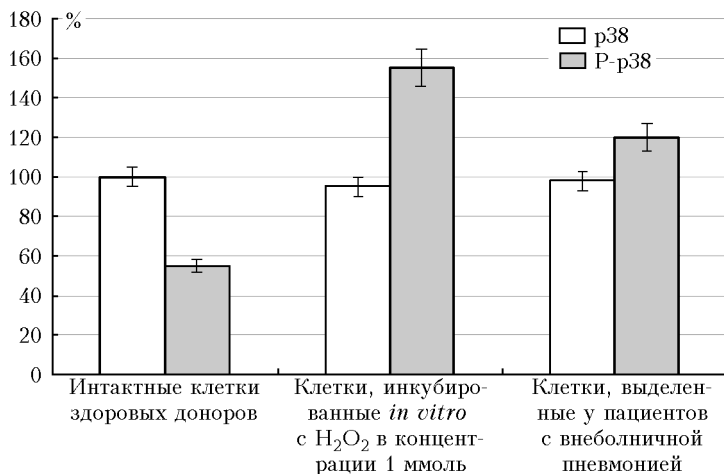


Рис. 17. Содержание общих и фосфоформ p38 MAPK в мононуклеарных лейкоцитах крови при окислительном стрессе (содержание белка p38 в интактной культуре здоровых доноров принято за 100%)

В результате проведенного исследования установлено существенное увеличение содержания фосфорформы киназы р38 в мононуклеарных лейкоцитах крови у больных внебольничной пневмонией и при экспериментальном окислительном стрессе по сравнению с интактными клетками (рис. 16). В случае инкубирования лейкоцитов с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль отмечалось более выраженное увеличение содержания в клетках фосфо-р38 по сравнению с таковым при остром воспалении (рис. 17).

С использованием метода вестерн-блоттинга обнаружено, что общий уровень JNK1/2 как в случае окислительного стресса *in vitro*, так и в клетках пациентов с внебольничной пневмонией не отличался от контрольных значений (рис. 18). Анализ фосфорформ JNK1/2 показал, что при инкубировании мононуклеарных лейкоцитов с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль отмечалось резкое увеличение уровня P-JNK1/2 по сравнению с интактными клетками. При этом наиболее существенно увеличивалось содержание фосфорформы JNK1 (р46) (рис. 18).

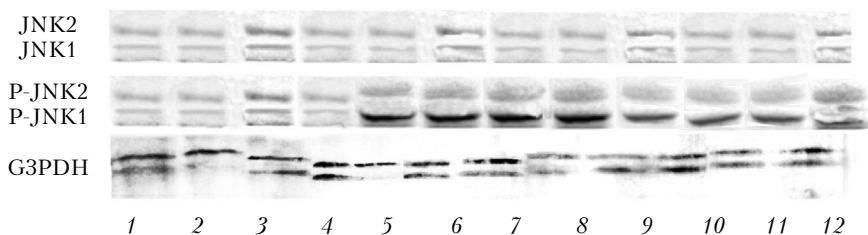


Рис. 18. Уровень общих и фосфорилированных форм MAP-киназ JNK, определенный методом вестерн-блоттинга, в культурах мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров (1–4 – интактная культура; 5–8 – культура после воздействия H_2O_2 в концентрации 1 ммоль) и у пациентов с внебольничной пневмонией (9–12); G3PDH – глицеро-3-фосфатдегидрогеназа

Культивирование мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у пациентов с внебольничной пневмонией, также сопровождалось повышением уровня P-JNK1/2: как и в случае окислительного стресса *in vitro* уровень фосфо-JNK1 (р46) был выше, чем фосфо-JNK2 (р54) (рис. 18, 19).

Таким образом, в условиях экспериментального окислительного стресса *in vitro* определялось более выраженное увеличение содержания фосфорформ MAP-киназ по сравнению с контролем и клетками, полученными у пациентов с внебольничной пневмонией. При этом повышение уровня P-р38 и P-JNK1/2 на фоне неизменного количества р38 и JNK1/2 было обусловлено активацией фосфорилирования данных MAP-киназ в условиях окислительного стресса в эксперименте

и при остром воспалении и, вероятно, не связано с изменением активности экспрессии данных ферментов в клетке.

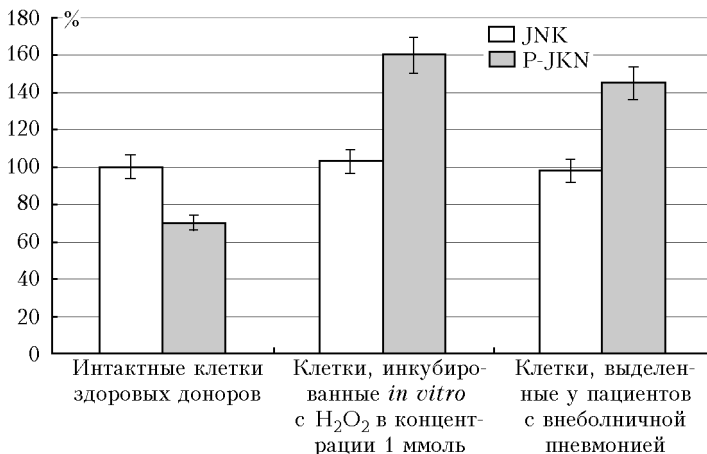


Рис. 19. Содержание общих и фосфорформ JNK1/2 в мононуклеарных лейкоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* и остром воспалении (содержание JNK1/2 в интактной культуре у здоровых доноров принято за 100%)

Результаты настоящего исследования подтверждаются данными литературы. Действительно, возрастанию уровня АФК соответствует увеличение содержания фосфорилированных форм JNK и p38 [155, 208, 261, 295].

АФК могут влиять на активность JNK и p38 посредством различных механизмов [65, 109, 239]. Известно, что АФК активируют белки MAPK Kinase Kinase (в частности, белок ASK1 – Apoptosis signal-regulating kinase 1, активирующий как JNK, так и p38), которые запускают сигнальный каскад [150, 440].

Собственно АФК-зависимая активация JNK реализуется по следующим путям:

- за счет диссоциации ASK из комплекса с тиоредоксином и последующих реакций фосфорилирования ASK → киназа MKK7 → JNK [150, 440];

- при диссоциации JNK из комплекса с глутатион-S-трансферазой класса Pi [248];

- при определенном значении внутриклеточной концентрации Ca²⁺ [221, 250];

- при образовании аддукта гидроксинафтоля (конечный продукт ПОЛ) с JNK [42, 411];

– за счет инактивации АФК фосфатаз (блокируют действие специфических ферментов) [25, 304]. Так, показано, что инактивация JNK-специфичной фосфатазы перекисью водорода вызывает длительную активацию данной киназы в отсутствие других антагонистов, что может существенно влиять на судьбу клетки [38, 268].

Поскольку АФК-индуцируемая активность JNK и p38 MAPK часто играет существенную роль в судьбе клетки, вызывали также интерес другие эффекты данных киназ при окислительном стрессе и их опосредованное влияние на реализацию программы апоптоза. В указанном аспекте было рассмотрено участие JNK и p38 MAPK в регуляции продукции цитокинов (в частности, IL-8 и IL-10) мононуклеарными лейкоцитами в условиях экспериментального окислительного стресса и при остром воспалении.

При выборе цитокинов учитывались следующие предпосылки. С одной стороны, продукция IL-8, обусловленная NF-κB-зависимой индукцией промотора гена *IL8*, может служить косвенным признаком активации данного транскрипционного фактора, предположительно участвующего в апоптозе; IL-10 вызывает интерес в силу своего антиапоптогенного действия. С другой стороны, данные цитокины обладают про- и противовоспалительным эффектами (IL-8 и IL-10 соответственно), что еще более обосновывает целесообразность оценки их продукции при окислительном стрессе в случае острого воспаления.

Интерлейкин-8 (NAP-1 (активирующий нейтрофилы пептид-1), NAF (фактор активации нейтрофилов), GCF (хемотактильный фактор гранулоцитов), NCF (хемотактильный фактор нейтрофилов)) синтезируется различными типами клеток (моноцитами, нейтрофилами, эндотелиальными клетками, митогенстимулированными Т-лимфоцитами) и является провоспалительным цитокином. К числу основных биологических эффектов IL-8 относятся индукция хемотаксиса нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, моноцитов и других иммунцитов, усиление ангиогенеза *in vivo* и *in vitro*. Повышенный уровень IL-8 ассоциируется с хроническими и острыми воспалительными состояниями [262]. Данный интерлейкин продуцируется под воздействием бактериальных эндотоксинов и цитокинов, главным образом TNFα и IL-1. Окислительный стресс также может индуцировать продукцию IL-8, активируя ядерные факторы транскрипции. Показано, что редокс-чувствительные транскрипционные факторы, такие как NF-κB и AP-1, активируются в клетках, участвующих в воспалении, приводя к ур-регуляции некоторых провоспалительных генов [309, 404].

Интерлейкин-10 — фактор, ингибирующий синтез цитокинов, относится к противовоспалительным медиаторам, блокирующим эффекты лимфоцитарных и макрофагальных провоспалительных цитокинов и подавляющим функцию антигенпрезентирующих клеток. Он стимулирует в моноцитах экспрессию растворимых рецепторов TNF α (sTNF — естественных ингибиторов TNF α) [455] и увеличивает продукцию антагониста IL-1R (IL-1Ra), ингибирующего связывание IL-1 с мембранным рецептором [236, 293]. IL-10 продуцируется клетками Th типа 2, В-лимфоцитами, моноцитами и эпителиальными клетками [47, 96, 216, 400]. Данный цитокин способен подавлять апоптоз [252], в частности В-лимфоцитов и активированных Т-клеток [96, 284, 286].

В проведенных собственных исследованиях для оценки продукции цитокинов IL-8 и IL-10 в супернатантах интактных, перекисью-стимулированных и культивированных с ингибиторами MAP-киназ мононуклеарных лейкоцитов определяли содержание цитокинов, используя метод иммуноферментного анализа.

Принцип метода основан на том, что микропланшет покрывается моноклональными антителами к hIL-8 или hIL-10 («Biosource», США). В ходе реакции в лунки планшета добавляются стандарты, контроли, неизвестные образцы и биотинилированные моноклональные антитела против hIL-8 или hIL-10. Во время первой инкубации антиген hIL-8 (hIL-10) связывается с иммобилизованными в лунках антителами одним сайтом связывания и с биотинилированными антителами в растворе — вторым сайтом связывания. После удаления избытка вторых антител добавляется стрептовидин-пероксидаза, которая связывается с биотинилированными антителами с формированием «сэндвич»-комплекса из четырех реагентов. После второй инкубации и промывки несвязавшийся фермент удаляется, затем добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментом с образованием цветного комплекса. Интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации hIL-8 (hIL-10), присутствующего в образце.

В соответствующие ячейки микропланшета вносили по 50 мкл стандартов № 0–7, контролей и исследуемых образцов. Затем в каждую лунку планшета добавляли 100 мкл биотинилированных антител к hIL-8 или hIL-10, инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После трехкратного цикла промывки автоматическим вошером в каждую ячейку вносили по 100 мкл раствора субстрата с красителем и инкубировали при комнатной температуре в затемненном месте. Через 10–15 мин в каждую ячейку добавляли по 100 мкл стоп-реагента (серная кислота в концентрации 0,5 моль). Измерение оптической плотности проводили на микропланшетном фотометре «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрации hIL-8 и hIL-10 вычисляли по калибровочной кривой.

Полученные данные показали, что уровень IL-8 в супернатантах мононуклеарных лейкоцитов крови у здоровых доноров в условиях окислительного стресса *in vitro* был выше контрольных значений.

Содержание IL-8 в супернатантах мононуклеарных лейкоцитов у пациентов с острым аппендицитом и внебольничной пневмонией также превышало контрольные значения и соответствующие значения при окислительном стрессе, индуцированном H₂O₂ в концентрации 1 ммоль (табл. 6).

Сравнительный анализ показал, что содержание IL-8 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов у больных острым аппендицитом и внебольничной пневмонией превышало таковое при экспериментальном окислительном стрессе. Применение ингибитора JNK SP600125 в условиях культивирования мононуклеарных клеток у здоровых доноров с H₂O₂ в концентрации 1 ммоль сопровождалось снижением содержания IL-8 в супернатантах (табл. 6). При культивировании мононуклеарных лейкоцитов, полученных у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями (острый аппендицит и внебольничная пневмония), с ингибитором JNK также выявлялось значимое уменьшение содержания IL-8 по сравнению с интактными культурами клеток данных больных. При этом уровень IL-8 был выше контрольных значений и статистически не отличался от такового при инкубировании интактных клеток с H₂O₂ в концентрации 1 ммоль (табл. 6).

Таблица 6

Содержание IL-8 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов при ингибировании MAP-киназ p38 и JNK в условиях окислительного стресса *in vitro* и при остром воспалении (Me (Q₁-Q₃))

| Условия культивирования клеток | Содержание IL-8, нг/мл |
|---|---|
| Интактная культура мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров | 130,0 (121,5–131,4) |
| Инкубирование клеток здоровых доноров с H ₂ O ₂ в концентрации 1 ммоль | 140,0 (137,0–146,0) <i>p</i> ₁ < 0,001 |
| Инкубирование клеток здоровых доноров с H ₂ O ₂ в концентрации 1 ммоль и ингибитором p38 ML3403 | 140,5 (138,1–147,9) <i>p</i> ₁ < 0,001 <i>p</i> ₂ > 0,001 |
| Инкубирование клеток здоровых доноров с H ₂ O ₂ в концентрации 1 ммоль и ингибитором JNK SP600125 | 100,0 (90,0–114,0) <i>p</i> ₁ < 0,01 <i>p</i> ₂ < 0,001 <i>p</i> ₃ < 0,001 |
| Интактная культура клеток больных острым аппендицитом | 159,0 (157,0–165,0) <i>p</i> ₁ < 0,001 <i>p</i> ₂ < 0,05 <i>p</i> ₃ < 0,05 <i>p</i> ₄ < 0,001 |

| Окончание табл. 6 | |
|---|---|
| Условия культивирования клеток | Содержание IL-8, нг/мл |
| Интактная культура клеток у пациентов с внебольничной пневмонией | 160,0 (159,0–163,0) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,001$ $p_5 > 0,05$ |
| Инкубирование клеток у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями с ингибитором р38 ML3403 | 151,0 (138,0–164,0) $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 < 0,001$ $p_5 > 0,05$ $p_6 > 0,05$ |
| Инкубирование клеток у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями с ингибитором JNK SP600125 | 139,5 (136,7–142,0) $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 < 0,001$ $p_5 < 0,05$ $p_6 < 0,05$ $p_7 > 0,05$ |

Примечание. p_1 – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе; p_2 – по сравнению с аналогичными показателями в эксперименте с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль; p_3 – по сравнению с аналогичными показателями в эксперименте с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль и ингибитором ML3403; p_4 – по сравнению с аналогичными показателями в эксперименте с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль и ингибитором SP600125; p_5 – по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с острым аппендицитом; p_6 – по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с внебольничной пневмонией; p_7 – по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями и ингибитором р38 ML3403.

В соответствии с полученными в ходе исследования данными ингибитор р38 MAPK ML3403 не влиял на продукцию IL-8 мононуклеарными клетками крови здоровых доноров в условиях окислительного стресса *in vitro* и при культивировании лейкоцитов, взятых для изучения у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями (табл. 6).

Исходя из представленных результатов, можно заключить, что уровень IL-8 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов был выше контрольных значений как в случае экспериментальной модели окислительного стресса *in vitro*, так и при остром воспалении. В эксперименте с использованием селективного ингибитора SP600125 установлено, что редокс-чувствительная киназа JNK (в отличие от р38) влияет на продукцию IL-8 (табл. 6).

Показано, что для экспрессии воспалительных медиаторов – цитокинов, металлопротеиназ и адгезивных молекул – необходима активация JNK в присутствии АФК [25, 248]. Высокая концентрация АФК в месте воспаления индуцирует MAP-киназу JNK, ускоряющую активацию воспалительных медиаторов, и уничтожает посредством апоптоза клетки, утратившие способность к регуляции клеточного цикла. На рис. 20 представлена схема участия JNK в АФК-индуцированной экспрессии гена *IL-8*.

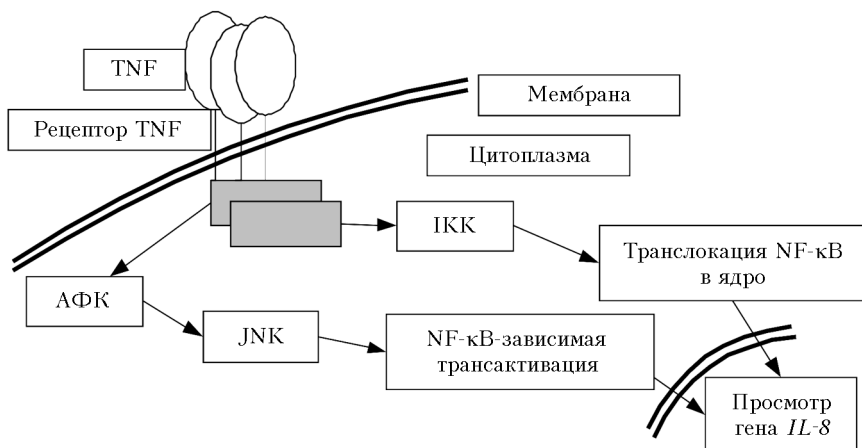


Рис. 20. Участие JNK1 в NF-κB-зависимой индукции промотора гена *IL-8* (по данным С. Влаопулос, В.С. Зумпурлис, 2004)

Многочисленные результаты исследований свидетельствуют, что регуляция *IL-8* MAP-киназами различается в зависимости от природы стимулов [287, 301, 313, 420] и типа клетки [313, 361, 367, 399, 404]. Так, синтез *IL-8* в эпителиальных и эндотелиальных клетках индуцируется окислительным стрессом, вызванным экзогенной H_2O_2 [223, 397]. Этот факт подтверждают и результаты проведенного эксперимента. После культивирования мононуклеарных лейкоцитов крови, полученной у здоровых доноров, с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль определялось, как показано ранее, повышенное содержание *IL-8* в супернатантах клеток (см. табл. 6). Тиольные антиоксиданты, в частности эрготионин, способны ингибировать транскрипционную активность *IL-8* [242].

Данные, характеризующие роль p38 MAP-киназы в регуляции синтеза *IL-8*, более противоречивы. Показано, что ингибитор p38 MAPK (SB203580) значительно снижает продукцию данного цитокина, опосредуя свое действие через NF-κB [285, 301, 450]. Вместе с

тем результаты исследования L.F. Li и соавт. [313] свидетельствуют об отсутствии изменения экспрессии и секреции IL-8 при ингибировании p38 MAPK. Предположительно, регуляция данных процессов осуществляется через активацию AP-1, NF-κB, зависящую от JNK и NIK (NF-κB-inducing kinase).

Прямое влияние свободных радикалов, образованных при действии TNFα, на AP-1 может являться одним из механизмов реализации воспалительного процесса [223, 242]. Блокада киназы p38 вызывает значительное снижение синтеза провоспалительных цитокинов, в том числе TNFα [289], а ингибирование JNK снижает продукцию клетками IL-8 [313, 450] (см. табл. 6). Большинство генов, кодирующих данные медиаторы, содержат в регуляторной области участок связывания с AP-1 и NF-κB [404].

Таким образом, роль стрессактивированных киназ JNK и p38 в экспрессии и секреции клетками IL-8 в условиях окислительного стресса весьма неоднозначна и требует дальнейшего изучения.

Помимо исследования продукции IL-8 в настоящей работе проводилась оценка содержания IL-10 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов (окислительный стресс *in vitro* и острое воспаление).

Как показали полученные результаты, в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов при инкубировании клеток с H₂O₂ в концентрации 1 ммоль содержание IL-10 соответствовало контрольным значениям. Оценка данного параметра в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов у пациентов с острым аппендицитом и внебольничной пневмонией выявила аналогичную картину (табл. 7). Добавление ингибиторов JNK SP600125 и p38 ML3403 в культуры клеток не вызывало изменений продукции IL-10 мононуклеарными лейкоцитами (табл. 7).

Таблица 7

Содержание IL-10 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов при ингибировании MAP-киназ p38 и JNK в условиях окислительного стресса *in vitro* и при остром воспалении (Me (Q₁–Q₃))

| Условия культивирования клеток | Содержание IL-10, нг/мл |
|---|--|
| Интактная культура мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров | 330,2 (220,4–353,9) |
| Инкубирование клеток здоровых доноров с H ₂ O ₂ в концентрации 1 ммоль | 330,2 (199,6–353,9) <i>p</i> ₁ > 0,05 |
| Инкубирование клеток здоровых доноров с H ₂ O ₂ в концентрации 1 ммоль и ингибитором p38 ML3403 | 110,5 (62,6–281,5) <i>p</i> ₁ > 0,05 <i>p</i> ₂ > 0,05 |

Окончание табл. 7

| Условия культивирования клеток | Содержание IL-10, нг/мл |
|---|--|
| Инкубирование клеток здоровых доноров с H ₂ O ₂ в концентрации 1 ммоль и ингибитором JNK SP600125 | 156,8 (51,4–250,4) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ |
| Интактная культура клеток больных острым аппендицитом | 156,8 (90,2–268,1) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$ |
| Интактная культура клеток у пациентов с внебольничной пневмонией | 287,4 (184,3–287,4) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$ $p_5 > 0,05$ |
| Инкубирование клеток у больных острыми воспалительными заболеваниями с ингибитором р38 ML3403 | 268,1 (156,8–308,1) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$ $p_5 > 0,05$ $p_6 > 0,05$ |
| Инкубирование клеток у больных острыми воспалительными заболеваниями с ингибитором JNK SP600125 | 199,6 (87,4–330,2) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$ $p_5 > 0,05$ $p_6 > 0,05$ $p_7 > 0,05$ |

Примечание. p_1 – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе; p_2 – по сравнению с аналогичными показателями в эксперименте с H₂O₂ в концентрации 1 ммоль; p_3 – по сравнению с аналогичными показателями в эксперименте с H₂O₂ в концентрации 1 ммоль и ингибитором ML3403; p_4 – по сравнению с аналогичными показателями в эксперименте с H₂O₂ в концентрации 1 ммоль и ингибитором SP600125; p_5 – по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с острым аппендицитом; p_6 – по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с внебольничной пневмонией; p_7 – по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями и ингибитором р38 ML3403.

Таким образом, изменений содержания IL-10 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов при окислительном стрессе *in vitro* и при острых воспалительных заболеваниях не установлено. Известно,

что индукторами синтеза IL-10 выступают липополисахариды, TNF α , IL-1 и другие провоспалительные факторы [400]. Однако регуляторные механизмы данного явления на внутриклеточном уровне до конца не ясны. Показано, что продукция IL-10 зависит от активации тирозинкиназ и протеинкиназы C [224, 283], а также от участия факторов, повышающих уровень цАМФ [212, 240, 457]. Транскрипционные факторы Ets-1 и SP-1 связываются с промотором IL-10, активируя транскрипцию гена [468].

Для выяснения роли p38 и JNK MAP-киназ в регуляции синтеза IL-10 при окислительном стрессе были использованы их селективные ингибиторы (ML3403 и SP600125 соответственно). Оказалось, что в условиях дисбаланса окислительного метаболизма данные киназы не влияют на продукцию IL-10 мононуклеарными лейкоцитами (см. табл. 7). Анализируя полученные результаты, можно предположить, что при окислительном стрессе редокс-сигнальные системы не включаются в продукцию антиапоптотического IL-10, обеспечивая тем самым возможность для запуска летальной программы клеток. Вместе с тем имеются сведения о блокировании синтеза IL-10 ингибитором p38 MAPK SB202190 [315] в моноцитах человека, стимулированных липополисахаридом. Однако исследование ЛПС-индуцированной продукции IL-10 тучными клетками показало, что ингибитор SB203580 снижал соотношение TNF α и IL-10 [400]. Подтверждение гипотезы об участии p38 MAPK в регуляции синтеза провоспалительных медиаторов (TNF α , IL-1 β , IL-6) было получено в работе T. Shoji и соавт. [289].

Влияние ингибиторов p38 MAPK SB202190 и SB203580 на продукцию IL-10 клетками при липополисахаридной индукции может различаться из-за способности SB202190 частично блокировать (помимо p38) протеинкиназу C. По мнению A.D. Фоеу и соавт. [400], продукция IL-10 требует наличия двух сигналов: от липополисахарида (или его физиологических эквивалентов) и эндогенных TNF α или IL-1.

Полученные результаты доказывают, что роль киназ JNK и p38 в экспрессии и секреции клетками IL-8 и IL-10 в условиях дисбаланса окислительного метаболизма весьма неоднозначна. Однако факт возрастания продукции IL-8 может свидетельствовать об активации в условиях окислительного стресса JNK транскрипционных факторов (в частности, NF- κ B). Последний в ряде случаев может выполнять как про-, так и антиапоптогенную функцию. Отсутствие возрастания продукции антиапоптотического цитокина IL-10 является одним из условий для активации летальной программы клеток. Кроме того, в условиях изменения окислительного метаболизма имеет место отчет-

ливый дисбаланс между продукцией про- и противовоспалительных цитокинов (IL-8 и IL-10 соответственно) в пользу первых. Данные тенденции характерны как для экспериментального окислительного стресса, так и для острого воспаления.

В целом рассмотренные в данной главе результаты исследования свидетельствуют об участии MAP-киназ JNK и p38 в реализации запрограммированной гибели мононуклеарных лейкоцитов крови при окислительном стрессе в условиях *in vitro* и в клинике острого воспаления. Регуляторное влияние данных MAP-киназ может быть опосредовано другими редокс-чувствительными элементами внутриклеточных систем сигнальной трансдукции, в частности транскрипционными факторами. Среди последних важнейшую роль в инициации или блокировании летальной программы клеток играют p53 и NF-κB, влияющие на баланс про- и антиапоптогенных белков-регуляторов.

Глава 4

УЧАСТИЕ РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ АПОПТОЗА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Известно, что АФК влияют на жизнеспособность клетки, изменяя экспрессию генов за счет транскрипционных факторов, которые связываются с регионами генов-мишеней и изменяют их транскрипцию. Находясь в цитоплазме в неактивном состоянии, данные факторы не могут влиять на генетическую информацию. Сигнальное событие (непосредственное воздействие АФК, фосфорилирование киназами и др.) приводит к транслокации белковых субъединиц транскрипционного фактора в ядро [462].

Одним из важнейших редокс-регулируемых транскрипционных факторов является р53. Под контролем р53 находится огромное число генов, белковые продукты которых в ответ на различные стрессорные воздействия индуцируют апоптоз, клеточное старение или арест деления клетки [67]. Другим транскрипционным фактором, активирующимся в условиях окислительного стресса, считается NF-κB. Данный протеин играет существенную роль в регуляции иммунного ответа, воспалительной реакции, а также в контроле клеточного деления и апоптоза [65, 176, 267, 373].

Механизмы взаимодействия транскрипционных факторов NF-κB и р53 относятся к числу наиболее противоречивых вопросов в оценке влияния генотоксического стресса на жизнедеятельность клетки. Несмотря на накопленный к настоящему времени фактический материал о роли NF-κB и р53 в жизнедеятельности клетки, имеются значительные пробелы в оценке исходов активации данных транскрипционных факторов в зависимости от природы индуцирующего сигнала и сопутствующих условий стимуляции. Неоднозначность влияния названных транскрипционных факторов на реализацию апоптоза затрудняет понимание их участия в возникновении нарушений летальной программы клеток при окислительном стрессе. Указанное обстоятельство явилось предпосылкой для проведения исследования роли NF-κB и р53 в реализации прогаммированной гибели при дисбалансе окислительного метаболизма.

4.1. Про- и антиапоптогенная функция p53. Роль p53 в регуляции апоптоза при окислительном стрессе

Транскрипционный фактор p53 активируется в ответ на различные варианты клеточного стресса и необходим для управления антипролиферативными процессами и регуляции опухолевой супрессии. Разные стрессовые сигналы (гипоксия, окислительный стресс, дефицит глюкозы и др.) приводят к повышению его концентрации в цитоплазме [260, 358]. Повреждение ДНК, гипоксия, нарушения экспрессии онкогенов, радиация и другие воздействия индуцируют активность p53, реализуемую в репарации ДНК, клеточном старении либо запуске программы апоптоза. Нарушения регуляции перечисленных процессов (клеточное бессмертие, генетическая нестабильность) при дисфункции p53 позволяют поврежденным клеткам выживать [169], а развитие опухолей зачастую сопряжено с инактивацией данного фактора транскрипции.

Различные варианты исхода p53-активации могут быть связаны с типом клеток, характером и силой индуцирующего воздействия. Так, гамма-радиация приводит к апоптозу тимоцитов и p53-зависимому аресту клеточного цикла в фазе G1 у фибробластов [417]. Увеличение содержания Bcl-2 в клетках лимфомы обуславливает p53-зависимое старение клеток, а воздействие циклофосфамида на них — запуск программы апоптоза [227].

Выбор той или иной функциональной роли p53 объясняется различными механизмами. Согласно одним данным, промоторы p53-зависимых генов индуцируются при достижении экспрессии p53 определенного уровня и формируют уникальный профиль транскрипции, реализующий определенный клеточный ответ. Подтверждением этой модели служат экспериментальные данные об аресте деления клетки при низком содержании p53 и об апоптозе — при высоком [137].

По другим сведениям, на исход активации p53 влияет не его количество, а совокупность сопутствующих факторов: роль других сигнальных путей, генетические особенности [322]. Показано, что усиление экспрессии Muc вызывает смену p53-эффекта с ареста деления на апоптоз. В данном случае p53-зависимый клеточный арест ограничивается индукцией циклинзависимого киназного ингибитора p21 при повреждении ДНК. Однако при этом p53 не активирует p21, а Muc не влияет на p53-обусловленную транскрипцию апоптогенных молекул [419].

Существует предположение, что структура p53 может зависеть от активирующего стимула и (или) типа клеток, в связи с чем гамма- и ультрафиолетовое (УФ) излучения способны индуцировать разные

гены в одних и тех же клеточных линиях [137]. Стимуляция соответствующих промоторов или рекрутирование определенных коактиваторов и (или) корепрессоров индуцируют экспрессию разных генов-мишеней, реализующих различные клеточные ответы [381]. Установлено, что варианты модификации p53 при повреждении ДНК и гипоксии определяются их способностью ассоциироваться с определенными коактиваторами и корепрессорами [402]. Модификации p53 могут изменять способность данного транскрипционного фактора связываться с негативным регулятором MDM2 (p53-индуцибельная E3-убиквитин-лигаза, способная к деградации p53) [463]. Известно, что модификация p53 в большинстве случаев связана с фосфорилированием по различным остаткам [383]. Фосфорилированный по серину 46 p53 способен активировать эффектор апоптоза AIP1. Вместе с тем отсутствие Ser-46 в p53-дефицитных мышинных клетках не блокирует их летальную программу [353]. Активация p53 может обуславливаться транскрипционной модификацией [135, 233]. Показано, что длительная активация p53 обуславливает развитие дегенеративных заболеваний (артрит, множественный склероз, нейропатии) [246], а недостаточная экспрессия сопряжена с возникновением опухолей.

Таким образом, активация p53 за счет широкого диапазона эффектов — от замедления деления клетки до гибели — имеет принципиальное значение для ее жизнедеятельности. В свою очередь, знание механизмов регуляции активности данного транскрипционного фактора позволяет прояснить его роль в запуске программы апоптоза.

Одной из важнейших функций p53 является участие в регуляции программированной гибели клеток (рис. 21); p53 способен прямо активировать гены, продукты которых обеспечивают инициацию летальной программы, однако его проапоптотическая активность ограничена трансактивационными способностями [237]. Установлено, что экспрессия транскрипционно неактивного, но связывающегося с ДНК p53 приводит к нарушению программы апоптоза [127].

По некоторым сведениям, p53 может выполнять и антиапоптотическую функцию, в частности, за счет p53-зависимого PTEN (негативного регулятора PI3-киназного пути). Под влиянием антиапоптотических цитокинов происходит активация PI3-киназы, продукция фосфатидилинозитола и активация Akt, запускающего разные механизмы выживания [266].

Установлено, что индукция p53 вызывается увеличением содержания внутриклеточных АФК еще до запуска апоптотической программы. При этом увеличивается экспрессия генов, влияющих на окислительно-восстановительный метаболизм клетки (обеспечение

необходимыми антиоксидантами) [245]. Нарушение баланса антиоксидантных ферментативных систем обуславливает увеличение содержания внутриклеточных АФК. Некоторые антиоксиданты (например, N-ацетилцистеины) способны предотвращать p53-зависимую гибель клеток [147, 245].

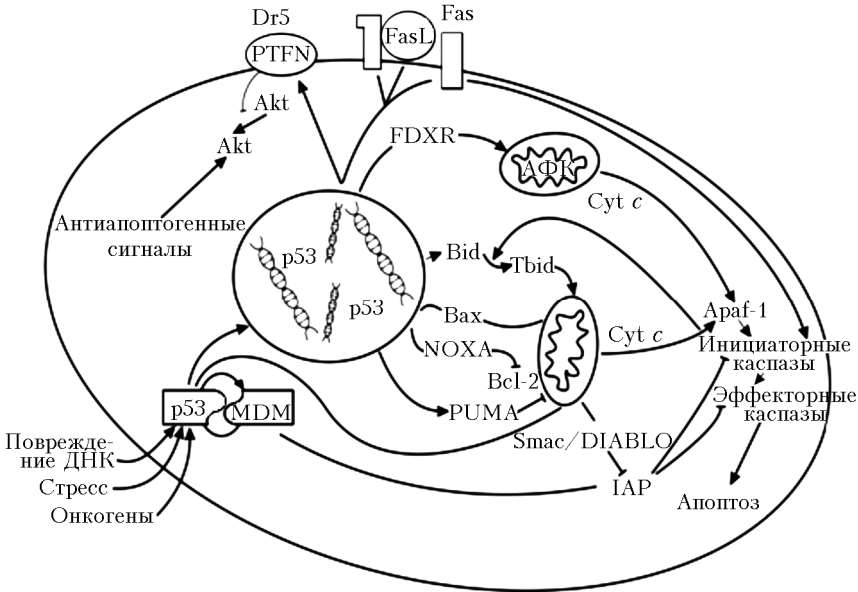


Рис. 21. Участие p53 в регуляции апоптоза (по данным J.S. Fridman, S.W. Lowe, 2003): Akt – протеин-киназа с антиапоптотическим действием; Apaf-1 – фактор, активирующий апоптотические протеазы 1; Bax – проапоптотический белок семейства Bcl-2 (Bcl-2-associated X protein); Bcl-2 – антиапоптотический белок семейства Bcl-2 (B-cell lymphoma 2); Bid – проапоптотический белок семейства Bcl-2 (BH3 interacting domain death agonist); Dr – рецептор смерти; FDXR – ферридоксин-редуктаза; Cyt c – цитохром c; IAP – протеины, ингибирующие апоптоз; MDM – p53-индуцибельная E3-убиквитин-лигаза, способная к деградации p53; NOXA – проапоптотический белок семейства Bcl-2; PTEN – липидная фосфатаза, опухолевый супрессор (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10); PUMA – проапоптотический белок семейства Bcl-2 (p53 upregulated modulator of apoptosis)

Показано, что под влиянием химиотерапевтического агента 5-фторфлуорацила в p53-содержащих клетках карциномы кишечника специфически повышается экспрессия гена ферредоксин редуктазы (FDXR) [245]. Содержание и активность p53 может регулироваться оксидоредуктазами в зависимости от изменений редокс-статуса клетки [294, 403].

Инструментом апоптогенного влияния p53 может быть не только трансактивация, но и трансрепрессия (подавление активности) определенных генов [203]. Такое явление может быть обусловлено способностью p53 привлекать диацетилазы гистонов к определенным генам через mSin3a корепрессор [182]. Мишенью p53-опосредованной репрессии является Survivin, кодирующий ингибитор апоптоза IAP. Увеличение экспрессии последнего блокирует летальную программу клеток [371]. Возрастание частоты повышенной экспрессии Survivin во многих опухолях человека также связывают с мутациями p53 [451].

Дополнительная, не обусловленная транскрипционными механизмами функция p53 связана с повышением экспрессии и аккумуляцией p53-мутантных протеинов в нефизиологических концентрациях [185, 452]. Согласно данным М. Mihaга и соавт., индуцированное стрессовыми воздействиями накопление p53 происходит на уровне митохондрий [369]. Так, введение p53 в митохондрии дефицитных по данному фактору мышей индуцирует апоптоз [369]. При этом полиморфные варианты p53 отличаются по способности к накоплению в митохондриях и апоптогенной функции [452]. Наличие в клетках мутантного p53, не обладающего способностью к трансактивации, препятствует запуску апоптоза [246].

Благодаря одновременной p53-регуляции различных уровней летальной программы вероятность ее реализации, а также возможность координации возрастает. Поскольку данный транскрипционный фактор контролирует несколько «смертельных» точек, одиночным эффектом апоптогенная активность p53 не ограничивается. Разнообразие мишеней p53 обуславливает такие комбинации его эффектов (сеть, а не линейные пути), которые позволяют координировать суицидальный механизм в зависимости от типа клеток, микроокружения и особенностей индуцирующего воздействия [246].

Для того чтобы охарактеризовать роль p53 в реализации апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови при окислительном стрессе, в настоящем исследовании проводилась оценка внутриклеточного содержания данного белка и его фосфорилированной формы с помощью метода вестерн-блоттинга.

Проведенный анализ содержания p53 в мононуклеарных лейкоцитах, выделенных из крови у здоровых доноров и больных острым воспалением (внебольничная пневмония), показал отсутствие исследуемого транскрипционного фактора в данных клетках. Наличие p53 в клетках было зафиксировано только в случае инкубации мононуклеарных лейкоцитов с перекисью водорода в концентрации 1 ммоль.

Известно, что p53 имеет короткий период полужизни и может инактивироваться в зависимости от типа клеток и особенностей индуцирующего воздействия в течение 6–20 мин MDM2 убиквитинлигазой [445]. Поэтому p53 отсутствует в мононуклеарных лейкоцитах у пациентов с внебольничной пневмонией в условиях длительного и мультифакторного (по сравнению с экспериментом) нарушения окислительного метаболизма организма.

В активации белка p53 участвуют редокс-чувствительные киназы JNK и p38. JNK фосфорилирует опухолевый супрессор p53 по Thr8. Когда JNK неактивна, она связывается с p53 на участке между остатками 97 и 116, что приводит к деградации белка в протеосомах [25]. Показано, что активация p38 через прямое фосфорилирование увеличивает содержание белка p53, который вторично усиливает апоптоз, индуцируя экспрессию и митохондриальную трансдукцию Bax [302, 329].

Для подтверждения предположения об участии JNK и p38 MAP-киназ в p53-опосредованной регуляции программированной клеточной смерти в нашей лаборатории был определен уровень фосфорформы p53 в мононуклеарных лейкоцитах при окислительном стрессе *in vitro* в присутствии ингибиторов MAP-киназ SP600125 и ML3403.

С помощью вестерн-блоттинга было выявлено наличие фосфорформы p53 в мононуклеарных лейкоцитах крови при экспериментальном окислительном стрессе *in vitro*. В результате инкубирования клеток с ингибитором JNK SP600125 и H₂O₂ в концентрации 1 ммоль определялось значительное снижение уровня фосфо-p53 по сравнению с таковым в культуре без ингибитора. Аналогичная тенденция зарегистрирована и в случае применения ингибитора p38 ML3403 (рис. 22, 23).

Результаты исследования свидетельствуют, что при культивировании мононуклеарных лейкоцитов с селективными ингибиторами JNK и p38 в условиях экспериментального окислительного стресса имеет место снижение содержания фосфорформы белка p53. Следует заметить, что применение как ингибитора JNK (SP600125), так и p38 (ML3403) предотвращало запуск апоптогенной программы, индуцированной окислительным стрессом (результаты приведены в гл. 3). Таким образом, полученные данные подтверждают факт участия редокс-чувствительных киназ JNK и p38 в p53-опосредованном апоптозе. С позиции p53 могут быть объяснены выявленные особенности реализации апоптоза мононуклеарных лейкоцитов при окислительном стрессе.



Рис. 22. Уровень фосфоформы р53 в культурах мононуклеарных лейкоцитов в условиях экспериментального окислительного стресса при ингибировании *in vitro* MAP-киназ р38 и JNK (по данным вестерн-блоттинга): 1–4 – клетки, инкубированные с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль; 5–8 – клетки, инкубированные с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль и ингибитором ML3403; 9–12 – клетки, инкубированные с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль и ингибитором SP600125

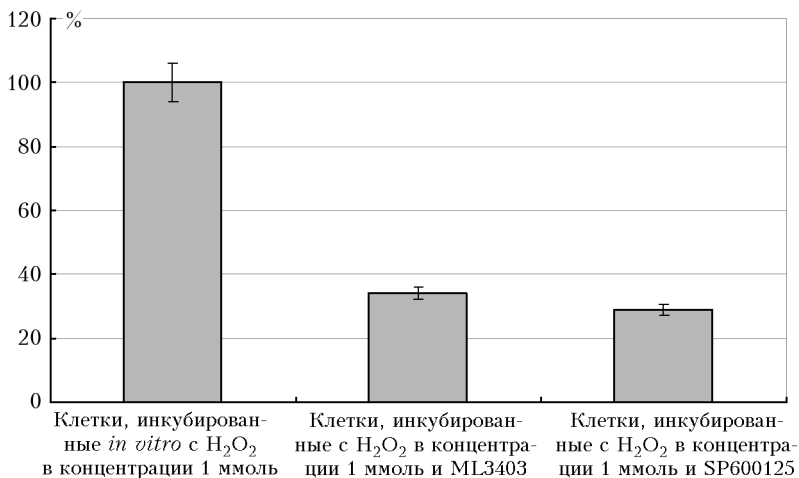


Рис. 23. Содержание фосфоформы р53 в мононуклеарных лейкоцитах в условиях окислительного стресса при ингибировании MAP-киназ р38 и JNK. Уровень фосфоформы р53 в культуре мононуклеарных лейкоцитов в условиях инкубирования с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль принят за 100%

Известно, что р53 необходим для реализации митохондриального пути апоптоза [201, 452]. Он способствует снижению трансмембранного митохондриального потенциала и выходу цитохрома с в цитоплазму, так как связывает антиапоптотические протеины Bcl-2 и Bcl-X_L [246, 383]. Помимо этого р53 трансактивирует такие проапоптотические эффекторы, как ген, кодирующий Araf-1. Последний задействован в активации каспазного каскада через коактивацию каспазы-9 [144]. р53 усиливает экспрессию каспазы-6, которая наряду с Araf-1 участвует в передаче апоптотического сигнала в присутствии цитохрома с [201].

Фактор транскрипции p53 может оказывать влияние на реализацию летальной программы через контроль редокс-чувствительного фермента P66Shc, участвующего в продукции АФК. Установлено, что белок P66 после активации генерирует митохондриальные АФК, выступающие в качестве сигнальных молекул для передачи апоптогенного сигнала, используя восстановительные эквиваленты из митохондриальной электронно-транспортной цепи. При этом P66 окисляет цитохром *c* и катализирует восстановление O_2 до H_2O_2 [74]. Возможно, высокий уровень продукции АФК в мононуклеарных лейкоцитах у больных острыми воспалительными заболеваниями и в случае экспериментального окислительного стресса обуславливается в том числе и активацией P66. Другим механизмом повышения уровня АФК в клетке может быть нарушение баланса ее антиоксидантных ферментативных систем, сопряженное с активацией p53. В частности, последний способен индуцировать экспрессию Mn^{2+} -супероксиддисмутазы и глутатион-пероксидазы, не влияя при этом на уровень каталазы [383].

Как свидетельствуют данные литературы, p53 способен осуществлять транскрипционный контроль апоптотических протеинов семейства Bcl-2 (мультидоменный Bax, только-BH3-протеины: PUMA, NOXA, Bid) [173, 346, 353]. Bax участвует в формировании пор пермеабилizационного перехода и митохондриального апоптозиндуцирующего канала [126, 157, 355]. Другие белки данного семейства, активируемые с помощью p53 (NOXA, PUMA и Bid) влияют на реализацию летальной программы опосредованно, связываясь с антиапоптотическими белками семейства Bcl-2 и инактивируя их [170, 229]. Исследование роли проапоптотических белков семейства Bcl-2 в сигнальном пути p53 показало, что отсутствие индукции апоптоза p53-зависимыми онкогенами в Bax-дефицитных мышечных фибробластах сопряжено с повышенной опухолевой трансформацией *in vitro* [356]. По данным L. Zhang и соавт. [203], повреждение Bax и PUMA в HCT116 клетках приводило к дефектам клеточной гибели.

Кроме того, p53 может участвовать в запуске апоптоза по внешнему пути, однако этот механизм регуляции на сегодняшний день остается до конца не изученным. Показано, что мишенями p53 являются рецептор смерти Fas/CD95 и ген, кодирующий Fas-лиганд TNFSF6 [303]. p53-индуцированная трансактивация Bid изменяет взаимоотношения между внешним и внутренним путями запуска апоптоза [173]. Кроме того, p53 повышает восприимчивость клеток к лигандам рецепторов смерти. Снижение такой сенсibilизации при

мутациях p53 формирует лекарственную устойчивость и иммунорезистентность опухолевых клеток [406].

Помимо p53 на реализацию летальной программы клеток оказывают влияние и другие транскрипционные факторы, при этом результирующий эффект определяется особенностями их взаимоотношений.

4.2. Функции ядерного фактора NF-κB и программированная клеточная смерть

Важнейшим транскрипционным фактором, активация которого отмечается при окислительном стрессе, является NF-κB [65]. Он участвует в различных процессах, сопряженных как с выживанием, так и с саморазрушением клеток. NF-κB обеспечивает функциональную состоятельность иммунцитов и реализацию воспалительного ответа за счет продукции цитокинов, хемокинов и их рецепторов [176, 267, 373], участвует в супрессии опухолей [376]. Роль NF-κB в индукции апоптоза представляется неоднозначной. Стимуляция транскрипции антиапоптотических генов, по данным J. Kucharczak и соавт. [448], ингибирует летальную программу. Однако в ряде случаев (в ответ на атипичные индукторы — ультрафиолетовое излучение, лекарственные вещества) активация NF-κB имеет проапоптотический эффект [200].

Установлено, что в качестве ядерного фактора NF-κB могут выступать классический димер p50/RelA (p65) или димеры из субъединиц p52 (p100), c-Rel и Rel-B [267]. Каждая частица NF-κB содержит N-терминальный Rel-гомологичный домен (RHO) из 300 аминокислот, обеспечивающих связывание с ДНК, димеризацию, локализацию в ядре и связывание с ингибитором IκB (Inhibitor kappa B). Состав ядерного фактора NF-κB определяется типом клеток, особенностями действия стимулов и временем, прошедшим с его начала [267, 375, 414]. Функция NF-κB-комплекса также зависит от специфики индуцирующих воздействий [377] (рис. 24).

Высвобождение NF-κB из комплекса с IκB может реализовываться классическим (каноническим) и неканоническим путями [267, 379]. Канонический вариант является реакцией на присутствие провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF-α), бактериальную инфекцию и воздействие липополисахаридов. При этом происходит разрушение комплекса NF-κB-IκB активированным IκB-киназным комплексом (ИКК) с деградацией IκB, что позволяет NF-κB транслицироваться в ядро.

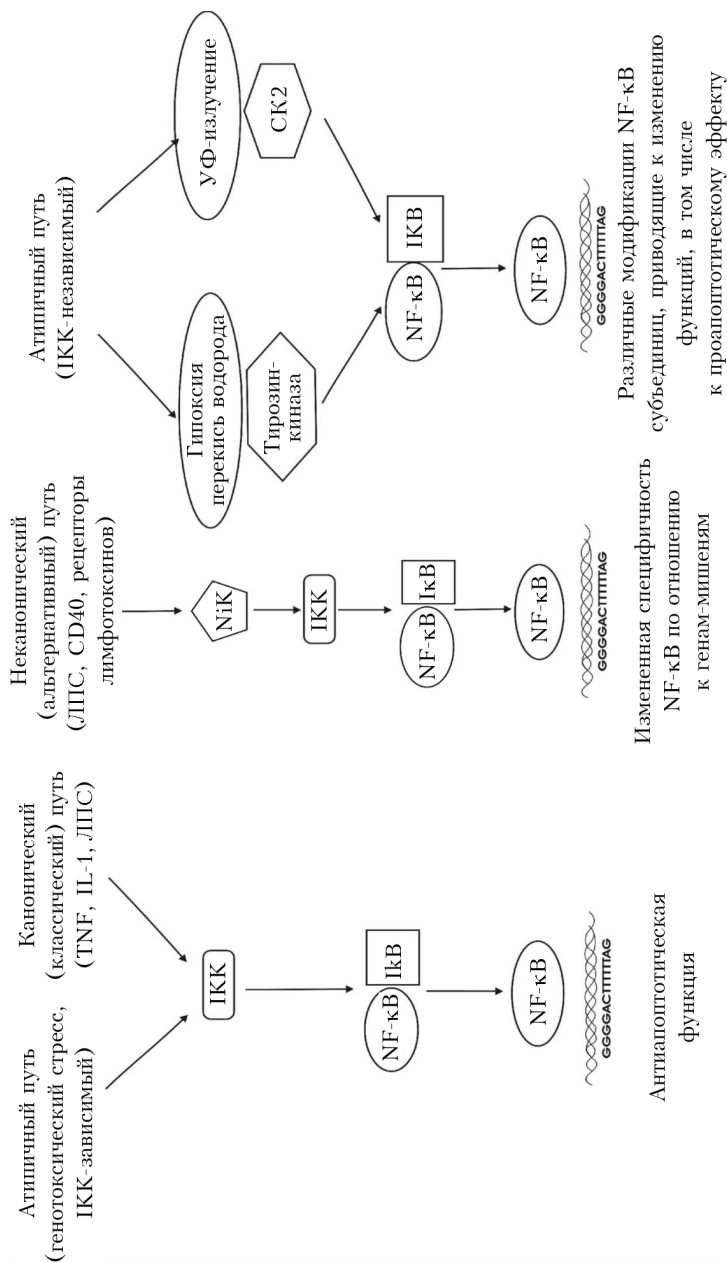


Рис. 24. Пути и исходы активации NF-κB (по данным N.D. Perkins, 2004; N.D. Perkins, T.D. Gilmore, 2006): SK2 – киназа 2; IκB – ингибитор κB; IKK – IκB-киназа; NIK – NF-κB-индуцирующая киназа; ЛПС – липополисахариды

В состав ИКК-киназы входят две каталитические субъединицы и множество копий регуляторной субъединицы, интегрирующей сигналы от вышерасположенных киназ и рецептор-ассоциированных структур. Как правило, активация канонического пути приводит к нуклеарной локализации p50/RelA (p65) в течение нескольких минут [359, 379]. Кроме того, возможны посттрансляционные изменения субъединиц NF-κB: фосфорилирование, ацетилирование и пролиновая изомеризация RelA. Не исключается прямое фосфорилирование RelA (p65) субъединицы ИКК по Ser563. Показано, что причиной ИКК-зависимой активации NF-κB может служить генотоксический стресс [189]. По данным S. Sacconi и соавт. [414], а также A. Hoffman и соавт. [271], с течением времени комбинация элементов NF-κB-комплекса может изменяться, что обуславливает вариабельность спектра индуцированных и репрессированных генов.

Ингибирование классического пути NF-κB-ответа связано с NF-κB-индуцированным увеличением экспрессии IκB. Синтезированная IκB транслоцируется в ядро и связывается с NF-κB, ингибируя и возвращая его в цитоплазму [267, 379].

Неканонический (альтернативный) путь активации NF-κB реализуется с помощью индуцирующей киназы NIK под влиянием фактора, активирующего В-клетки (семейство TNF), ЛПС, латентного мембранного протеина LMP-1, вируса Эпштейна–Барра (EBV), CD40 и рецептора лимфотоксина [176, 267].

Помимо рассмотренных физиологических (канонического и неканонического) путей активации NF-κB существуют и другие (ИКК-независимые) варианты его индукции. Экспрессия онкогена *Her2/NeU*, коротковолновое ультрафиолетовое излучение вызывают фосфорилирование и деградацию IκB киназой 2 [200, 388]. Некоторые стимулы (гипоксия и реоксигенация, стимуляция перекисью водорода и фактором роста нервов) обуславливают фосфорилирование IκB по тирозinovому остатку 42 [130, 210, 341, 456].

В ряде случаев функция NF-κB регулируется фосфорилированием киназой p38 без влияния на его способность к транслокации [365]. Однако p38 не фосфорилирует NF-κB напрямую, а индуцирует связывание RelA с коактиваторными протеинами [134], либо регулирует фосфорилирование гистона H3Ser10, активируя MSK1- и MSK2-киназы [415].

Фактор NF-κB регулирует не только ядерную, но и митохондриальную транскрипцию, подавляя экспрессию генов, кодирующих цитохром с оксидазу III и цитохром *c* [349]. Реализация функций NF-κB зависит от типа клеток, характера воздействующих на них сигналов и обуславливается разнообразием вариантов его взаимодействия с промо-

торами и энхансерами [377] (рис. 25). Показано, что NF-κB играет важную роль в процессах онкогенеза [376, 428]. Проонкогенный эффект реализуется в случае избыточной активации (либо ядерной локализации) NF-κB в опухолевых клетках, а также за счет чрезмерной экспрессии определенных белков. Так, блокирование летальной программы опухолевых клеток может быть связано с продолжительной индукцией антиапоптотических генов *Bcl-X_L*, *X-IAP*, *cIAP1* и *cIAP2* [448].

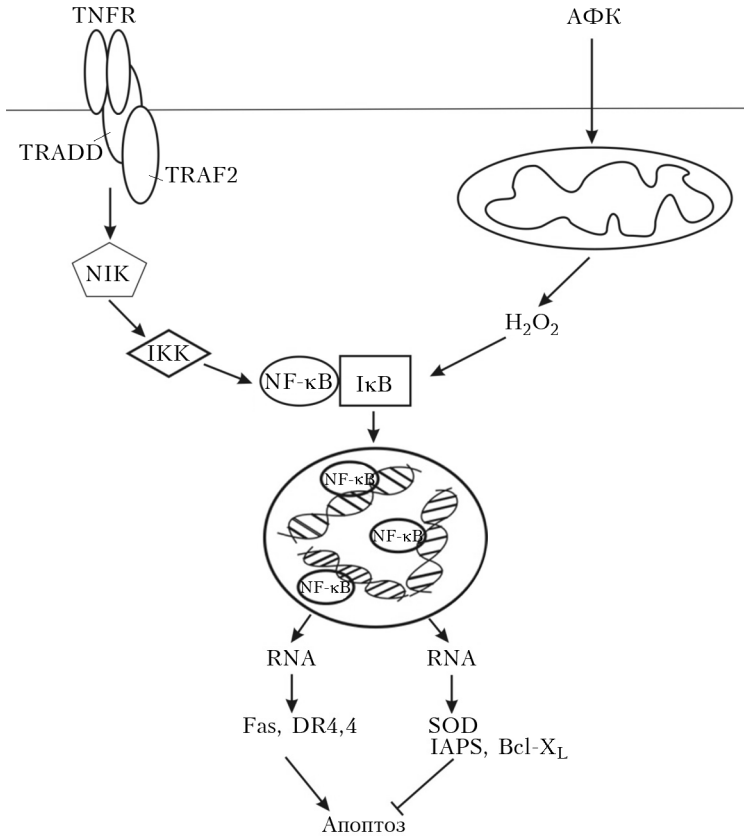


Рис. 25. Участие NF-κB в регуляции апоптоза (по данным М.Р. Mattson и соавт., 2000; J. Kucharczak и соавт., 2003): DR – рецептор смерти; IκB – ингибитор карра В; IKK – IκB-киназа; IAP – протеины, ингибирующие апоптоз; SOD – супероксиддисмутаза; NIK – NF-κB-индуцирующая киназа

К другим механизмам стимуляции опухолевой прогрессии фактором NF-κB относятся: индукция протоонкогенов циклина D1 и с-Мус;

молекул клеточной адгезии и матриксных металлопротеиназ, что обуславливает метастазирование опухоли; регуляция сосудистого эндотелиального ростового фактора, участвующего в процессе ангиогенеза, а также активности теломераз, необходимых для поддержания клеточного бессмертия [376, 428]. Согласно экспериментальным данным N.D. Perkins, T.D. Gilmore [377], NF-κB определяет грань перехода хронического воспаления в опухолевый процесс. Также доказано, что участие NF-κB в реализации программы апоптоза сводится не только к антиапоптотической активности в условиях опухолевой прогрессии, но и к проапоптотической функции при различных воздействиях на клетку (гипоксия/реоксигенация, лекарственные вещества) [448]. При этом NF-κB стимулирует экспрессию апоптозиндуцирующих генов (в частности, *Fas*, *Fas-L*, *DR4*, *-5*); репрессирует экспрессию антиапоптотических генов *bcl-x_L* в ответ на атипичные стимулы [189, 401, 409]. Вместе с тем, согласно K.J. Campbell и N.D. Perkins [190], физиологическая функция NF-κB определяется механизмом его индукции. Поэтому различные индукторы NF-κB (например, структурные аналоги антрациклина даунорубицин и доксорубицин) могут как стимулировать, так и ингибировать апоптоз [190, 448].

Активация NF-κB сенсibiliзирует клетки к индукции летальной программы на фоне прямых апоптогенных воздействий (TNF, повреждение ДНК, активация p53 и др.) [190]. Установлено, что повышение уровня АФК влияет на взаимодействие JNK и NF-κB. TNF индуцирует усиление генерации АФК клеткой, активацию JNK и апоптоз при ингибировании NF-κB. Однако на фоне активации данного фактора окислительный стресс подавляется за счет индукции генов антиоксидантных ферментов (магний-супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы). По сведениям C. Bubicic и соавт. [350], H. Kamata и соавт. [395], в большинстве типов клеток NF-κB-зависимые супрессия АФК и блокирование JNK-киназы предотвращают индукцию апоптогенной программы.

Фактор NF-κB играет важную роль и в реализации воспалительного ответа [267]. Активация этого фактора транскрипции на поздней стадии воспаления сопряжена с увеличением экспрессии противовоспалительных генов и запуском апоптоза. Ингибирование NF-κB в данной ситуации, напротив, удлинит воспалительный ответ, уменьшает экспрессию p53, *Bax* и блокирует летальную программу клеток [370, 380].

Таким образом, роль NF-κB в реализации апоптоза и других клеточных ответов при различных иницирующих воздействиях весьма неоднозначна. В связи с этим представлялось интересным выяснить, каким образом данный транскрипционный фактор участвует в реализации апоптогенной программы при окислительном стрессе. Для этого

методом вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител определяли внутриклеточное содержание субъединицы p65 NF-κB, не связанной с ингибитором IκB.

Проведенное исследование продемонстрировало отсутствие данного транскрипционного фактора в мононуклеарных лейкоцитах у здоровых доноров. Оценка уровня NF-κB в интактных мононуклеарных клетках крови у больных острым воспалением и при экспериментальном окислительном стрессе, индуцированном перекисью водорода с концентрацией 1 ммоль, обнаружила появление данного транскрипционного фактора в обоих случаях.

Очевидно, что и при остром воспалении, и при экспериментальном окислительном стрессе в культуре клеток, полученных у здоровых доноров, появление p65 сопряжено с избыточной АФК-продукцией в мононуклеарных лейкоцитах, поскольку данный транскрипционный фактор является редокс-чувствительным [65]. Зарегистрированное в собственном исследовании присутствие p65-субъединицы транскрипционного фактора в мононуклеарных клетках свидетельствует о деградации комплекса NF-κB с ингибиторным белком IκB.

Можно предположить, что причиной разрушения данного комплекса в мононуклеарных лейкоцитах крови при экспериментальном окислительном стрессе является действие АФК в отсутствие других активационных факторов, таких как TNFα, бактериальные липополисахариды. Присутствие активной формы NF-κB (p65 субъединицы) в мононуклеарных клетках крови у больных с острым воспалением, вероятно, обусловлено не только увеличением содержания внутриклеточных АФК (атипичного стимулятора NF-κB), но и наличием других факторов. Многокомпонентность индуцирующих воздействий в клинике острого воспаления не позволяет определить индивидуальные механизмы активации NF-κB. Можно лишь предположить, что в качестве индуцирующих сигналов в этом случае выступают, помимо АФК, бактериальные липополисахариды и TNFα. Так, в ходе проведенного исследования установлена повышенная продукция TNFα – индуктора активации NF-κB по альтернативному и каноническому пути. Помимо представленных результатов о содержании субъединицы p65 в мононуклеарных лейкоцитах при окислительном стрессе следует, вероятно, упомянуть о косвенном свидетельстве активации NF-κB, связанной с повышением продукции IL-8, обозначенной ранее в гл. 3.

Таким образом, проведенное исследование позволило обнаружить факт редокс-зависимой активации NF-κB, ответственного за выживание клеток и пролиферацию [376, 448], с одной стороны, и проапоптогенного фактора p53 – с другой [227, 312]. Противоречивость данных

литературы о взаимодействии и свойствах NF-κB и p53 при окислительном стрессе не позволяет однозначно толковать полученные результаты. Однако, согласно информации С. Culmsee и соавт. [396], в качестве наиболее вероятных типов коммуникации этих молекул можно выделить два варианта: 1) активация p53 предшествует индукции NF-κB, что приводит к проапоптогенному эффекту данного фактора; 2) после стрессового воздействия происходит параллельный запуск p53- и NF-κB-опосредованных сигнальных путей, взаимодействующих друг с другом.

Как было сказано выше, полученные результаты исследования содержания транскрипционных факторов p53 и NF-κB демонстрируют наличие p53 и незаингибированной NF-κB (субъединицы p65) в мононуклеарных лейкоцитах крови здоровых доноров при действии перекиси водорода в концентрации 1 ммоль. Вместе с тем, итог активации p53 и NF-κB — усиление запрограммированной гибели клеток при окислительном стрессе *in vitro* — может свидетельствовать о неэффективности антисуицидального эффекта NF-κB в регуляции. Возможно, указанные факторы транскрипции конкурируют между собой за один пул генов-коактиваторов, в связи с чем повышение активности p53 будет ограничивать эффективность функционирования NF-κB [413].

Выявленное отсутствие антиапоптотического эффекта активации NF-κB может объясняться различными причинами, о чем свидетельствуют данные литературы. Согласно N.D. Perkins, T.D. Gilmore [377], смена функции NF-κB с антиапоптотической на проапоптотическую обуславливается природой инициирующего сигнала. По другим данным, проапоптотическая роль NF-κB реализуется при воздействии лишь определенных стимулов — УФ-излучения, доксорубина.

Однако итоговый результат транскрипционной активности NF-κB и p53 определяется во многом особенностями ответа генов-мишеней [270]. В связи с этим следующим шагом исследования явилась оценка экспрессии мРНК и содержания белков-регуляторов апоптоза в мононуклеарных лейкоцитах при окислительном стрессе.

Глава 5

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ БЕЛКОВ-РЕГУЛЯТОРОВ АПОПТОЗА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Среди генов, являющихся мишенями NF- κ B и p53, важную роль в регуляции летальной программы клеток играют гены, кодирующие белки семейства Bcl-2 с про- и антиапоптотической функцией. Баланс системы этих белков определяет исход индукции запрограммированной гибели. Данное соотношение может обуславливаться как активацией экспрессии соответствующих генов, так и посттрансляционной модификацией протеинов [195, 462]. Чтобы выяснить, вовлечены ли указанные механизмы в дисрегуляцию апоптоза клеток при окислительном стрессе, было проведено исследование, результаты которого отражены в данной главе.

Белки семейства Bcl-2, часть которых выполняет проапоптогенную функцию, а часть способна ингибировать летальную программу, формируют комплексную сеть взаимодействий, определяющую характер клеточного ответа на стрессовые воздействия [177, 206]. Известно, что все протеины данной группы содержат в качестве консервативных регионов Bcl-2 гомологичные домены (BH) (рис. 26) [123, 174].

Проапоптотические белки семейства Bcl-2 представлены двумя функционально и структурно различающимися подклассами: только-BH3-протеины (Bim, PUMA, Bid, Bad, Bik, Bmf, Hrk, NOXA) с BH3-регионом и содержащие множественные BH3-домены (BH1, BH2, BH3) белки Bax и Bak. Только-BH3-протеины, являясь начальными ступенями каскада запускаемых стрессовыми воздействиями реакций, активируют белки второй подгруппы, инициируя тем самым апоптоз [275]. Bax и Bak содержат множественные BH3-домены (BH1, BH2 и BH3) и являются нижележащими мишенями только-BH3-протеинов при запуске летальной программы [166, 172, 218, 441]. Антиапоптотические протеины семейства Bcl-2 – Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A1 – содержат четыре региона гомологичных последовательностей (BH4).

Функция проапоптотических только-BH3-протеинов заключается в связывании с определенными антиапоптотическими молекулами и запуске летальной программы клеток [275]. Наличие BH3-домена,

необходимое для проявления данной функции, позволяет адаптировать амфипатическую α -спиральную конформацию данных белков для встраивания в гидрофобную петлю антиапоптотических протеинов [394, 432, 444], блокируя их действие. При этом каждый из четырех консервативных гидрофобных остатков (расположены на одной стороне амфипатической петли) ВН3-домена встраивается в соответствующий карман гидрофобной петли антиапоптотического белка. Показано, что в результате мутационных изменений структуры ВН3-доменов может происходить снижение афинности только-ВН-3-протеинов к их мишеням, приводящее к нарушению проапоптотической функции [394, 432].

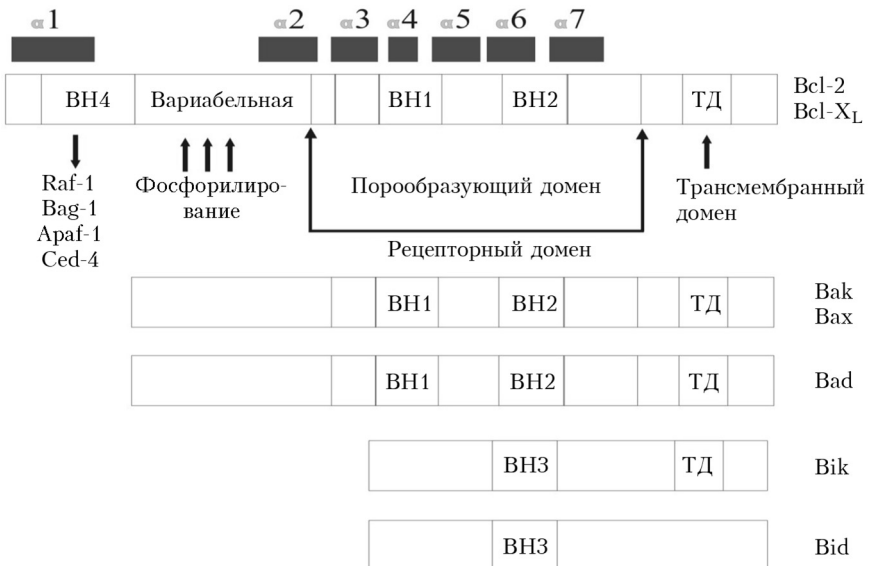


Рис. 26. Структурно-функциональная организация белков семейства Bcl-2 (по данным М.А. Пальцева, 2004): ТД — трансмембранный домен; Bad — проапоптотический белок семейства Bcl-2 (Bcl-2-associated death promoter); Bag-1 — усиливает антиапоптотические свойства белков семейства Bcl-2; Bak — проапоптотический белок семейства Bcl-2; Bax — проапоптотический белок семейства Bcl-2; Bcl-2 — антиапоптотический белок семейства Bcl-2; ВН — Bcl-2 гомологичный домен; Bid — проапоптотический белок семейства Bcl-2; Bik — проапоптотический белок семейства Bcl-2; Ced-4 — гомолог Bcl-2; Raf-1 — серин/треонин-специфичная киназа

Разные проапоптогенные сигналы инициируют активность определенных только-ВН-3-протеинов. Установлено, что Bim участвует в удалении аутореактивных Т- и В-лимфоцитов [171, 320] и блокиро-

вании острого Т-клеточного ответа [129, 423]. Дефицит данного белка вызывает снижение восприимчивости клеток к апоптогенным стимулам в условиях *in vitro* (лишение цитокинов, изменение кальциевого гомеостаза) и ослаблению процессов элиминации лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов у мышей [171].

Протеин Bad необходим для реализации апоптоза в лишенных эпидермального фактора роста (EGF) эпителиоцитах млекопитающих [154], а Bid — для инициации летальной программы фибробластов и гепатоцитов при стимуляции рецепторов смерти [174]. Установлено, что р53-зависимое (при повреждении ДНК) увеличение экспрессии белков PUMA [346, 391] и NOXA [353] сопряжено с реализацией летальной программы клеток. NOXA участвует в апоптозе фибробластов и эпителиальных клеток [282, 368], в то время как PUMA необходим для различных типов клеток. Уменьшение его экспрессии предотвращает индуцированный отсутствием цитокинов, глюкокортикоидами, форболэстером либо стауреспорином апоптоз [368, 392].

Мишенями только-BH3-протеинов выступают проапоптогические белки Bax и Bak, активация которых является принципиальным событием для реализации летальной программы [258]. Данные белки функционально заменяемы, поэтому дефицит каждого из них по отдельности не приводит к заметным нарушениям программы клеточной гибели. Сочетанный же недостаток функции Bax и Bak вызывает серьезные сдвиги в системе апоптогенных взаимодействий [218, 441]. Согласно экспериментальным данным, большинство Bax/Bak-дефицитных мышей умирают в перинатальном периоде, а у выживших животных происходит избыточное накопление клеток в разных тканях и отмечается отсутствие клеточной реакции на апоптогенные стимулы и повышение экспрессии только-BH3-протеинов [166, 172, 385].

Неактивная форма Bax представляет собой растворенный в цитоплазме клеток мономерный протеин. Он содержит гидрофобный С-концевой якорный домен, соответствующий желобку антиапоптогических молекул, с которыми взаимодействуют только-BH3-протеины [437]. Апоптогенный сигнал вызывает конформационную перестройку Bax на С- и N-концах, благодаря чему данный протеин транслоцируется на внешнюю мембрану митохондрий и образует олигомерный комплекс [143, 157, 165, 274].

В отличие от Bax неактивный протеин Bak уже интегрирован во внешнюю митохондриальную мембрану. Его участие в реализации летальной программы также связано с конформационными изменениями и формированием олигомерных комплексов [143, 157]. При реализации летальной программы клетки гомоолигомерные комплексы

Вах и Вак взаимодействуют друг с другом [151], а также с некоторыми другими белками – VDAC [422, 459], tBid [159] и Map-1 [325]. Олигомеризация Вах и Вак изменяет проницаемость митохондриальной мембраны, способствуя выходу цитохрома *c* в цитозоль из межмембранного компартмента митохондрий [132, 257, 453] (рис. 27). По одной из гипотез, Вак действует на пермеабилizационный переход, влияет на свойства имеющихся в мембране пор, образованных VDAC, ANT и циклофилином D. В результате данных изменений матрикс митохондрий набухает, а их внутренняя мембрана разрывается [308].

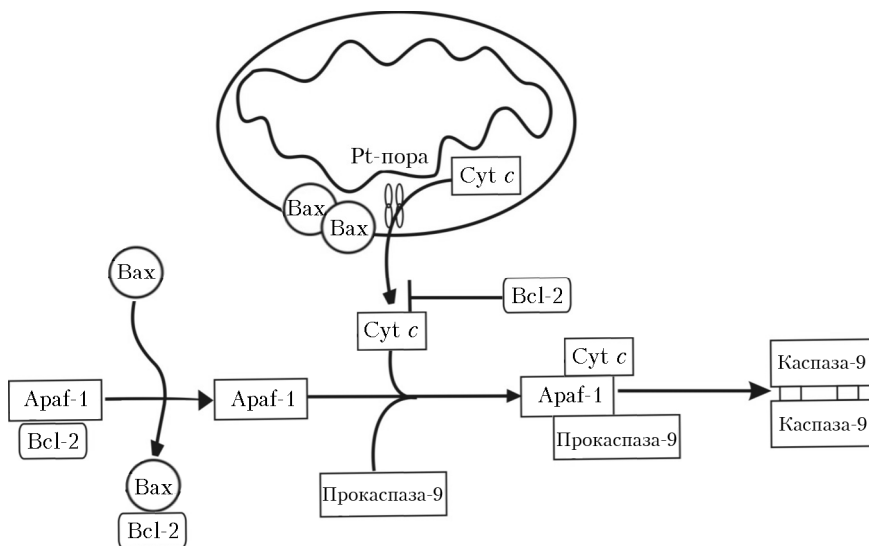


Рис. 27. Участие белков семейства Bcl-2 в регуляции проницаемости митохондриальной мембраны (по данным Y. Tsujimoto, 1998): Apaf-1 – фактор, активирующий апоптотические протеазы-1 (apoptotic protease activating factor 1); Bax – проапоптотический белок семейства Bcl-2 (Bcl-2-associated X protein); Bcl-2 – антиапоптотический белок семейства Bcl-2 (B-cell lymphoma 2); Cyt *c* – цитохром *c*; Pt-пора – пора пермеабилizационного перехода

Другая гипотеза нарушения проницаемости митохондриальной мембраны основывается на сходстве структур Вах и Вак с бактериальными порообразующими токсинами. Агрегаты данных белков нарушают целостность внешней митохондриальной мембраны, способствуя выходу цитохрома *c* в цитоплазму. Действительно, олигомеризованный рекомбинантный Вак формирует в искусственных мембранах поры, обеспечивающие выход молекул, сходных по размеру с

цитохромом *c* [143, 155, 170]. Состав данного канала (MAC) характеризуется отсутствием пор внешней мембраны VDAC, TOM (translocase outer membrane) и наличием протеина Bax. Его свойства аналогичны таковым у олигомеризованного Bax в синтетических безбелковых мембранах [126, 355]. Однако функция белков Bax и Bak, локализованных в мембранах других внутриклеточных органелл — рибосом, лизосом, эндоплазматического ретикулума, на сегодняшний день не выяснена [156].

Изучение антиапоптотической активности белков семейства Bcl-2 (эксперименты с повышенной экспрессией генов и в случае Bcl-2-дефицитных клеток) демонстрирует, что увеличение уровня любого из них блокирует гибель индуцирующее воздействие токсических агентов [206]. Несмотря на функциональную перекрываемость антиапоптотических белков, исследования прицельных генных мутаций свидетельствуют о некоторой дифференцированности действия данных протеинов *in vivo* [206, 393]. Установлено, что Bcl-2 защищает от гибели клетки развивающихся почек [162], протеин A1 — нейтрофилы [128], а белок Bcl-w — клетки Сертолли в яичках [146, 439]. Дефицит Mcl-1 блокирует способность к имплантации эмбрионов [328], а недостаточность Bcl-X_L приводит к их гибели вследствие апоптоза клеток нервной и гемопоэтической систем [167]. Исследования химерных мышей и мышей с дефицитом генов показывают, что белок Mcl-1 обеспечивает выживание гемопоэтических стволовых клеток, зрелых T- и B-лимфоцитов [219, 354].

Точный механизм действия антиапоптотических протеинов на данный момент не известен, однако проведенные исследования позволили значительно продвинуться в указанном направлении [269]. Так, определены трехмерные структуры Bcl-2, Bcl-X_L и Mcl-1 [426], что позволяет предположить особенности механизмов их действия. Молекулы Bcl-2, Bcl-X_L и Mcl-1 образуют гидрофобную незащищенную петлю за счет спирального изгиба гидрофобного хеликса с ВН1-3-доменами. Это обеспечивает антиапоптотическую функцию [174] данных белков и возможность их связывания с соответствующими проапоптотическими молекулами [394, 432, 444]. Установлено, что белки Bcl-2 и Bcl-X_L предупреждают увеличение проницаемости мембраны и выход проапоптотических факторов из митохондрий [254, 259].

Несмотря на многочисленность данных литературы, до настоящего времени не существует единой теории, объясняющей механизмы действия Bcl-2. Множественность функций этого протеина обуславливает наличие различных гипотез его действия. Показано, что данный белок ответственен за поддержание редокс-баланса в клетке [429]. По

мнению С. Vrenner и соавт. [160], Bcl-2 обладает каналформирующей функцией, встраиваясь в липидную мембрану, он блокирует ион-проводящую активность транслокатора адениновых нуклеотидов ANT. Согласно Т. Ito и соавт. [164], действие Bcl-2 связано с его фосфорилированием (дефосфорилированием) либо с образованием гетеродимеров с проапоптотическими белками семейства Bcl-2, блокирующими их воздействие на митохондриальную мембрану [174, 342].

Взаимодействия между протеинами разных подклассов семейства Bcl-2 регулируются только-BH-3-протеинами и объясняются разными моделями. Модель прямой активации подразумевает разделение только-BH-3-протеинов на сенсibilизаторы (в частности, Bim, связывающийся с Bax и Bak) и депрессоры (например, Bad, образующий комплексы с антиапоптотическими белками). Программа клеточной гибели инициируется сенсibilизаторами (депрессорами) путем перемещения активаторов от антиапоптотических белков с последующей активацией Bax и Bak [170, 229].

Модель антиапоптотической нейтрализации предполагает индукцию летальной программы только-BH-3-протеинами за счет их взаимодействия с антиапоптотическими молекулами. Данное событие приводит к спонтанной активации белков Bax и Bak [195] (рис. 28).

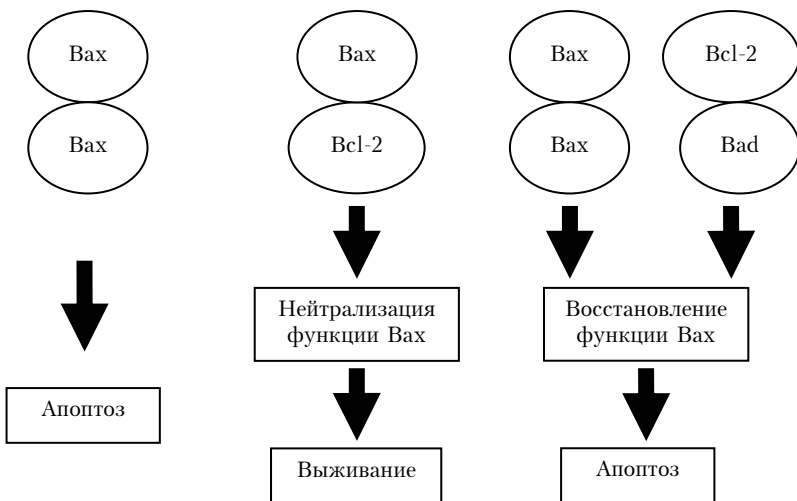


Рис. 28. Взаимодействие между белками семейства Bcl-2 (по данным А. Burlacu, 2003): Bad – проапоптотический белок семейства Bcl-2; Bax – проапоптотический белок семейства Bcl-2; Bcl-2 – антиапоптотический белок семейства Bcl-2

По мнению ряда авторов, все только-ВН-3-протеины связываются с антиапоптотическими белками [170, 229]. Часть из них (Bim, PUMA, tBid) могут напрямую активировать Bax и Bak. Другие только-ВН-3-протеины (Bad, Bik, Nrk, NOXA) индуцируют апоптоз опосредованно, через связывание с антиапоптотическими белками и перемещение прямых активаторов Bim, PUMA и tBid. Предполагается, что аффинность Bad для Bcl-2 выше, чем у Bid ВН3-белков [229].

По данным L. Chen и соавт. [195], одни только-ВН3-протеины характеризуются высоким сродством ко всем антиапоптотическим протеинам (т.е. большей апоптогенной активностью), а другие — более избирательным связыванием. При этом антиапоптотические белки играют особую роль в определении судьбы клетки: каждый из них должен быть нейтрализован для индукции летальной программы. Это может обеспечиваться совместной функцией только-ВН3-протеинов с ограниченным профилем связывания (NOXA для Mcl-1, A1 и Bad для Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w) либо активностью пан-специфичного Bim [195].

Антиапоптотические белки ингибируют Bax и Bak путем их секвестрирования либо вследствие изменения состояния белково-липидных взаимодействий в митохондриальных мембранах. Последнее представляется более вероятным, так как Bcl-2 локализован на мембране, а Bax растворим в цитозоле в мономерной форме [273, 276].

Связывание Bcl-2 с Bax на митохондриях предотвращает Bax-активацию и образование пор с его участием [387]. Mcl-1 и Bcl-X_L секвестрируют Bak за счет взаимодействия с его ВН3-доменами, также предупреждая митохондриальное повреждение [384]. Дефицит этих антиапоптотических протеинов активирует Bax, индуцируя запуск летальной программы клеток [459].

Таким образом, про- и антиапоптогенные белки регулируют реализацию программы апоптоза. Модуляция баланса различных активирующих и ингибирующих взаимодействий данных протеинов играет определяющую роль в судьбе клетки. В связи с этим при изучении молекулярных механизмов регуляции летальной программы в условиях окислительного стресса особый интерес представляло исследование экспрессии и содержания про- и антиапоптотических белков (Bcl-2, Bcl-X_L, Bax, Bad). Вероятно, взаимодействие данных протеинов определяется состоянием редокс-зависимых сигнальных систем клеток, включающих в том числе MAP-киназы и факторы транскрипции NF-κB и p53. Если MAP-киназы могут непосредственно фосфорилировать белки-регуляторы апоптоза, действуя на посттрансляционном уровне, то транскрипционные факторы изменяют

экспрессию соответствующих генов-мишеней. Исходя из данного предположения, в исследовании определялись экспрессия мРНК и содержание белков в мононуклеарных лейкоцитах при экспериментальном окислительном стрессе и остром воспалении. Кроме того, для оценки роли редокс-чувствительных MAP-киназных систем сигнальной трансдукции в механизмах нарушения баланса про- и антиапоптогенных белков при окислительном стрессе было исследовано содержание *Bcl-2* и *Bax* в мононуклеарных лейкоцитах, инкубированных с селективными ингибиторами SP600125 и ML3403.

Количественную оценку экспрессии РНК генов *bcl-2*, *bax*, *bcl-X_L* и *bad* мононуклеарных лейкоцитов осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, регистрирующего кинетику накопления продуктов амплификации исследуемых генов. Для этого в реакционную смесь добавляли интеркалирующий агент SYBR Green I («Molecular Probe», США), флуоресцирующий при связывании с формирующейся в процессе элонгации двухцепочечной ДНК. При этом интенсивность флуоресценции пробы возрастает пропорционально количеству продукта амплификации.

РНК выделяли с использованием гуанидин изотиоционата с последующей фенол-хлороформной экстракцией [198]. Качество выделения РНК оценивали с помощью электрофоретического разделения в 1,3%-м агарозном геле и буфере TAE (трис-уксусная кислота в концентрации 40 ммоль, ЭДТА в концентрации 1 ммоль (рН = 8,0)).

В случае обнаружения примесей (геномная ДНК) производили пересаживание пробы в LiCl в концентрации 2,5 моль инкубированием образцов сначала на льду (30 мин), затем при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (15 мин).

После этого синтезировали ДНК-копию на РНК-матрице при участии фермента обратной транскриптазы. Реакционная смесь содержала 9 мкл (0,5–2 мкг) РНК, 1 мкл (100 нг) статистического праймера (N9) (праймера, подобранного к среднестатистической последовательности ДНК), 10 мкл RT-буфера (трис-HCl в концентрации 20 ммоль (рН = 8,3), MgCl_2 в концентрации 5 ммоль, DTT в концентрации 10 ммоль, KCl в концентрации 100 ммоль, dNTP в концентрации 0,4 ммоль), 500 ед. акт. ДНК-зависимой РНК-полимеразы (MoMLV-OT) («Biosan», Россия). Длительность реакции обратной транскрипции составляла 60 мин при температуре $42\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Амплификацию полученного фрагмента ДНК производили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием SYBR Green I на амплификаторе «IQ5» («Bio-Rad», США). Применение метода ПЦР с «горячим стартом» – отделение Taq-полимеразы, ДНК-матрицы и компонентов буфера от смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов и олигонуклеотидных праймеров слоем легкоплавкого парафина – позволило увеличить чувствительность и специфичность реакции амплификации. Благодаря этому реакция в пробирке начиналась, когда достигались температурные условия, необходимые для специфического отжига праймеров.

Режим амплификации предполагал предварительную денатурацию образцов ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 мин) и последующие 40 циклов, включавших денатурацию ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 с) и отжиг ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 45 с).

Праймеры для специфичной амплификации фрагментов кДНК генов *bcl-2*, *bcl-X_L*, *bax* и *bad* были предоставлены лабораторией фармакогеномики НИИ химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск).

Режимы амплификации (температура отжига праймеров, состав амплификационного буфера, а также параметры амплификационного цикла) для каждой пары праймеров подбирались индивидуально. Для этого проводили амплификацию при пяти последовательных четырехкратных разведениях кДНК с двойным повтором для каждой точки. Условиями, необходимыми для качественной реакции, считались:

- разница между значениями C_t (номер цикла в точке пересечения кинетической кривой порогового уровня) больше 0,5 цикла;
- индекс корреляции между расчетными и экспериментальными значениями количества кДНК в пяти точках (пять последовательных четырехкратных разведений) более 0,95;
- эффективность реакции амплификации более 90% ($E > 90\%$);
- специфичность реакции амплификации (отсутствие дополнительных пиков на кривой плавления).

Температуру плавления праймеров (T_m), характеризующую температуру отжига одигонуклеотидов на матрице, определяли эмпирически при проведении ПЦР, задавая градиент температур в пределах блока амплификатора. Температуру плавления продукта амплификации, определяющую температуру регистрации флюоресцентного сигнала, вычисляли при анализе кривой плавления.

Для нормализации начального количества мРНК в образце и эффективности обратной транскрипции измерялось количество кДНК генов *RPS26*, *PII*, *RPL32* (β -актин), характеризующихся одинаковой экспрессией во всех клетках.

При амплификации каждой серии проб ставили контроль (пять точек в двойных повторах, каждая последующая точка – пятикратное разведение предыдущей).

Для определения относительного количества кДНК в образце использовался критерий ddCt. Полученные результаты выражали в условных единицах (отношение числа циклов амплификации исследуемого гена к таковому генов, используемых в качестве нормализаторов).

Указанный фрагмент исследования проводили совместно с сотрудниками лаборатории фармакогеномики НИИ химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск).

Полученные данные свидетельствуют о повышении уровня экспрессии мРНК гена *bcl-X_L* в условиях окислительного стресса *in vitro* и при остром воспалении (табл. 8). Выраженное повышение экспрессии мРНК гена *bcl-X_L* по сравнению с контролем было зарегистрировано при культивировании мононуклеарных лейкоцитов с перекисью водорода в концентрации 1 ммоль. Уровень экспрессии мРНК гена *bcl-X_L* в случае острого воспаления не отличался от такового при экспериментальном окислительном стрессе и превышал соответствующие значения в контроле (табл. 8).

Таблица 8

Уровень экспрессии мРНК (усл. ед.) генов *bcl-2*, *bcl-X_L* и *bax* в мононуклеарных лейкоцитах крови у здоровых доноров, при экспериментальном окислительном стрессе и у пациентов с внебольничной пневмонией (*Me* (*Q₁–Q₃*))

| Регистрируемый показатель | Интактные клетки | Клетки, инкубированные с H ₂ O ₂ в концентрации 1 ммоль | Клетки, полученные у пациентов с внебольничной пневмонией |
|---------------------------|------------------|---|---|
| <i>bax</i> | 0,39 (0,23–0,63) | 1,64 (1,02–1,96) $p_1 < 0,05$ | 1,21 (1,02–1,45) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ |
| <i>bcl-X_L</i> | 0,50 (0,35–0,60) | 1,79 (1,52–2,27) $p_1 < 0,05$ | 0,89 (0,69–1,64) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ |
| <i>bcl-2</i> | 1,67 (1,37–2,96) | 3,23(2,63–3,71) $p_1 > 0,05$ | 2,77 (1,79–4,13) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ |

Примечание. p_1 – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями в интактной культуре мононуклеарных лейкоцитов; p_2 – по сравнению с окислительным стрессом *in vitro*.

Известно, что исследованный ген *bcl-X_L* кодирует антиапоптотический белок семейства Bcl-2 и является мишенью NF-κB [448]. В связи с этим логично было бы ожидать, что активация NF-κB приводит к индукции антисуицидальных генов-мишеней. Вместе с тем, как свидетельствуют представленные ранее данные, несмотря на адекватную стимуляцию NF-κB-зависимого антиапоптотического ответа, мононуклеарные лейкоциты вступают на путь запрограммированной гибели в условиях увеличения внутриклеточной АФК-продукции. Однако исследование содержания Bcl-X_L в мононуклеарных лейкоцитах крови у здоровых доноров (интактная культура, экспериментальный окислительный стресс) и у пациентов с острым воспалением не выявило различий указанного показателя в сравниваемых группах наблюдения (рис. 29). Полученные данные, вероятно, правомерно объяснить посттрансляционной модификацией Bcl-X_L, приводящей к изменению его нативной структуры и функции. В частности, возможна модификация указанного белка в результате фосфорилирования или взаимодействия с регуляторными ВНЗ-протеинами [384].

Анализ уровня экспрессии мРНК гена *bcl-2* в мононуклеарных лейкоцитах не выявил каких-либо достоверно значимых отличий по сравнению с контролем в случае воздействия H₂O₂ на клетки здоровых доноров и при остром воспалении (см. табл. 8). Инкубация клеток с H₂O₂ в концентрации 1 ммоль и острый воспалительный про-

цесс не сопровождался изменением экспрессии мРНК гена *bcl-2* по сравнению с контролем ($p > 0,05$) (см. табл. 8).

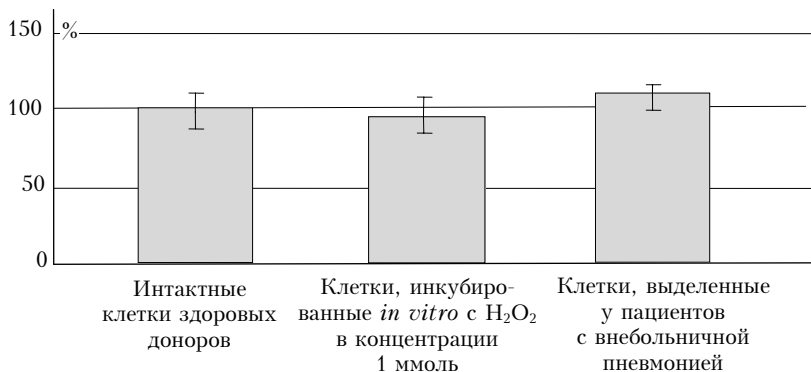


Рис. 29. Содержание Bcl-X_L в мононуклеарных лейкоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* и остром воспалении (содержание белка Bcl-X_L в интактной культуре здоровых доноров принято за 100%)

Анализ содержания антиапоптотического белка Bcl-2 в мононуклеарных лейкоцитах, выделенных из крови здоровых доноров, не выявил различий данного параметра в интактной культуре и при инкубации клеток с перекисью водорода в концентрации 1 ммоль. Оценка уровня Bcl-2 в мононуклеарных клетках крови, полученных у пациентов с внебольничной пневмонией, продемонстрировала отсутствие различий исследованного показателя с контролем (рис. 30).

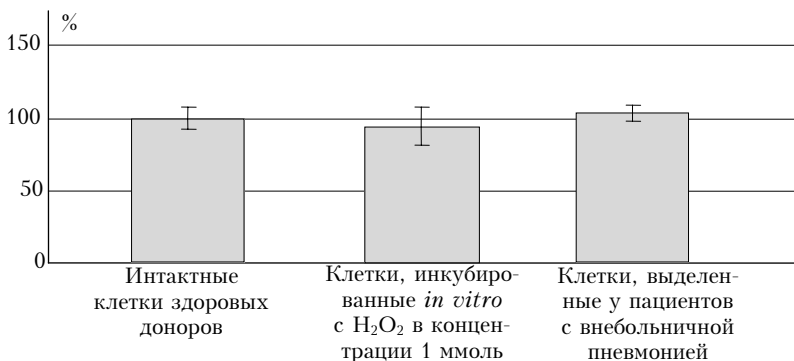


Рис. 30. Содержание Bcl-2 в мононуклеарных лейкоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* и остром воспалении (содержание белка Bcl-2 в интактной культуре здоровых доноров принято за 100%)

Описанные результаты исследования являются косвенным доказательством отсутствия редокс-чувствительного механизма регуляции активности Bcl-2 или подавления функции данного белка при дисбалансе окислительного метаболизма. Для того чтобы проверить данное предположение, оценивалось внутриклеточное содержание Bcl-2 при окислительном стрессе в присутствии ингибиторов MAP-киназ SP600125 и ML3403. Оказалось, что уровень белка Bcl-2 в мононуклеарных лейкоцитах крови, полученной у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями, возрастал как при действии ингибитора SP600125, так и ML3403. Это свидетельствует о том, что MAPK-опосредованные редокс-чувствительные механизмы препятствуют увеличению содержания антиапоптотического Bcl-2 в клетках при окислительном стрессе.

Исходя из полученных данных, отсутствие адекватного увеличения содержания в клетках антисуицидальных белков Bcl-X_L и Bcl-2 в ответ на апоптогенный стимул при экспериментальном окислительном стрессе и остром воспалении может быть причиной зарегистрированного повышения количества аннексинположительных мононуклеарных лейкоцитов.

Следующим этапом исследования было изучение содержания и экспрессии генов проапоптотических белков в мононуклеарных лейкоцитах при окислительном стрессе. Оценка уровня мРНК гена *bax* продемонстрировала, что статистически достоверное возрастание данного показателя относительно контрольного значения имело место в мононуклеарных лейкоцитах у больных с острым воспалением, а также в условиях экспериментального окислительного стресса. Вместе с тем значимые различия экспрессии мРНК *bax* при окислительном стрессе *in vitro* и внебольничной пневмонии отсутствовали (см. табл. 8).

Известно, что ген *bax* является мишенью транскрипционного фактора p53 [173]. Вероятно, увеличение экспрессии указанного гена свидетельствует об эффективной трансактивационной функции p53 в условиях дисбаланса окислительного метаболизма. Отсутствие различий экспрессии *bax* при окислительном стрессе *in vitro* и в случае острого воспаления позволяет предположить схожий механизм активации p53 в обеих ситуациях, несмотря на отсутствие белка p53 (за счет образования комплекса p53–MDM2) в клетках, полученных у пациентов с внебольничной пневмонией.

Анализ внутриклеточного содержания проапоптотического протеина Bax, проведенный методом вестерн-блоттинга, показал, что в мононуклеарных клетках крови у пациентов с острым воспалением

величина исследованного параметра превышала соответствующие значения в норме. Инкубация мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, с перекисью водорода в концентрации 1 ммоль приводила к возрастанию уровня Вах по сравнению с нормой, который, однако, не отличался от соответствующего параметра в группе больных острым воспалением (рис. 31). Добавление в культуральную среду ингибиторов MAP-киназ SP600125 и ML3403 снижало содержание белка Вах в мононуклеарных лейкоцитах у больных острым воспалением (по сравнению с таковым в интактных культурах). Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении редокс-чувствительных механизмов в детерминацию содержания проапоптотического белка Вах при окислительном стрессе.

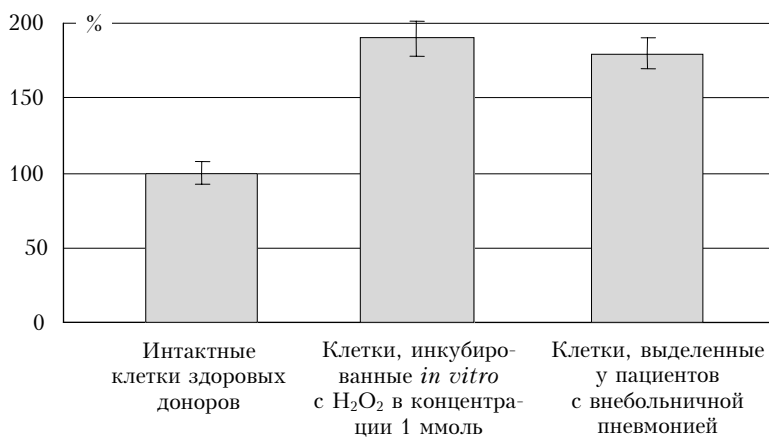


Рис. 31. Содержание Вах в мононуклеарных лейкоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* и остром воспалении (содержание белка Вах в интактной культуре здоровых доноров принято за 100%)

Поскольку важную роль в регуляции взаимоотношений между анти- и проапоптотическими белками семейства Bcl-2 играет группа только-ВНЗ-протеинов (Bad, Vim, tBid, PUMA, NOXA и др.), была также проведена оценка экспрессии мРНК гена *bad* и содержания белка Bad в мононуклеарных лейкоцитах в условиях окислительного стресса.

Оценка экспрессии мРНК гена *bad* не позволила выявить ее в мононуклеарных лейкоцитах у здоровых доноров (интактные культуры), а также при индукции окислительного стресса перекисью водорода и у пациентов с внебольничной пневмонией. Кроме того, исследование

содержания проапоптотического белка Bad продемонстрировало его отсутствие в мононуклеарных лейкоцитах при экспериментальном окислительном стрессе и в случае острого воспаления. Полученные данные доказывают отсутствие активации транскрипции гена *bad* при окислительном стрессе.

Таким образом, полученные собственные результаты свидетельствуют о повышении экспрессии мРНК генов как анти-, так и проапоптотических белков (*Bcl-X_L* и *Bax* соответственно) в мононуклеарных лейкоцитах в условиях окислительного стресса (при добавлении в культуральную среду перекиси водорода в концентрации 1 ммоль) и у пациентов с внебольничной пневмонией. При этом изменения уровня мРНК гена *bcl-2*, обладающего антисуицидальной активностью, в мононуклеарных лейкоцитах групп обследованных отсутствовали, а экспрессия мРНК гена *bad* в представленном исследовании не обнаружена. Поскольку ген *bcl-X_L* является мишенью ядерного фактора NF-κB, а ген *bax* — транскрипционного фактора p53, было высказано предположение, что в условиях окислительного стресса происходит активация данных транскрипционных факторов, выполняющих анти- и проапоптотические функции соответственно. Результаты проведенного исследования содержания белков-регуляторов апоптоза семейства *Bcl-2* свидетельствует об увеличении содержания проапоптотического протеина *Bax* в мононуклеарных лейкоцитах крови как в случае экспериментального окислительного стресса, так и при остром воспалении. Отсутствие изменений внутриклеточного уровня антиапоптотических *Bcl-X_L* и *Bcl-2* в условиях дисбаланса окислительного метаболизма может обуславливаться как посттрансляционными модификациями данных белков, так и регулирующим влиянием MAP-киназных каскадов (в случае *Bcl-2*).

Заключение

Эндогенная и экзогенная регуляция апоптоза, уравнивающего эффекты клеточной пролиферации, элиминации поврежденных, функционально неполноценных и инфицированных клеток, является актуальным аспектом теоретических исследований современной медицины. Факторы, оказывающие влияние на запуск и регуляцию программы клеточной гибели, весьма многочисленны и разнообразны.

В связи с этим особый интерес представляет получение новых знаний фундаментального характера об участии редокс-чувствительных сигнальных систем в дисрегуляции летальной программы клеток, направленных на разработку способов терапевтической коррекции нарушений апоптоза при патологических процессах и состояниях, сопровождающихся дисбалансом окислительного метаболизма. С этих позиций было предпринято комплексное исследование, направленное на идентификацию редокс-чувствительных молекулярных мишеней дисрегуляции апоптоза при окислительном стрессе. В качестве объекта исследования использована экспериментальная модель окислительного стресса (культивирование мононуклеарных лейкоцитов крови с перекисью водорода в концентрации 1 ммоль).

Исходя из условия, что воспаление является одним из типовых патологических процессов, сопряженных с развитием окислительного стресса, в программу исследования был также включен фрагмент определения молекулярных механизмов нарушения апоптоза мононуклеарных лейкоцитов при острых воспалительных процессах (внебольничная пневмония, острый аппендицит).

Как известно, при различных стрессовых воздействиях ответная реакция клетки прежде всего направлена на мобилизацию ресурсов для предотвращения негативных последствий и адаптации. АФК являются неотъемлемым элементом сигнальной трансдукции, участвуя в экспрессии ряда генов и обеспечивая процессы пролиферации и дифференцировки. Длительное стрессовое воздействие вызывает истощение антиоксидантной системы и избыточное накопление АФК, приводящее к

срыву адаптационных резервов клетки. Высокие концентрации АФК запускают механизмы апоптотической либо некротической гибели клеток, выбор которых определяется силой и характером инициирующего воздействия, состоянием систем репарации и антиоксидантной защиты. При этом клеточная стратегия при изменении редокс-статуса во многом определяется состоянием сигналпередающих систем.

Установлено, что усиление запрограммированной клеточной гибели мононуклеарных клеток крови характерно как для окислительного стресса *in vitro*, так и для острых воспалительных заболеваний. Данный факт подтверждается наличием положительной корреляционной связи между возрастом АФК-продукции и увеличением количества апоптотически измененных мононуклеарных лейкоцитов при экспериментальном окислительном стрессе ($r = 0,84$; $p < 0,05$) и острых воспалительных заболеваниях ($r = 0,71$; $p < 0,05$). Усиление запрограммированной гибели клеток, сопряженное с возрастом в них АФК, свидетельствует о вовлеченности редокс-чувствительных механизмов в регуляцию апоптоза.

В свою очередь, запуск летальной программы клеток может осуществляться за счет активации вне- и внутриклеточных путей ее инициации. В частности, взаимозависимыми являются продукция АФК, реализация апоптогенной программы и функция митохондрий. С одной стороны, митохондрии выступают в качестве мишеней регуляторных молекул в каскадах апоптогенных реакций, с другой — являются источником АФК (сигнальных молекул в данных каскадах). Митохондриальный путь запуска апоптоза включает в себя изменения электронного транспорта и клеточного редокс-баланса, взаимодействие про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2, открытие пор пермеабилizационного перехода между наружной и внутренней мембранами митохондрий, формирование каналов в наружной мембране, потерю митохондриального трансмембранного потенциала, а также выход апоптогенных факторов (цитохром *c*, Smac, AIF и др.).

В проведенном исследовании увеличение числа мононуклеарных клеток со сниженным значением трансмембранного потенциала митохондрий было зарегистрировано при окислительном стрессе *in vitro* и у пациентов с внебольничной пневмонией и острым аппендицитом. Редокс-зависимое снижение $\Delta\psi$ коррелировало с увеличением числа апоптотически измененных клеток при их инкубировании *in vitro* с H_2O_2 в концентрации 1 ммоль ($r = 0,78$; $p < 0,05$) и острым воспалении ($r = 0,69$; $p < 0,05$), выступая в качестве элемента активации апоптогенных механизмов в условиях дисбаланса окислительного метаболизма.

Другой путь инициации программированной клеточной гибели, также запускаемый в условиях избытка АФК, — рецепторный, позволяющий избирательно уничтожать клетки с определенной специфичностью рецепторов. Внеклеточные апоптогенные сигналы передаются с помощью мембраносвязанных или растворимых рецептор-специфических лигандов. Формирование лиганд-рецепторного комплекса приводит к кластеризации внутриклеточных частей рецептора, взаимодействию с внутриклеточными адаптерными молекулами, преобразующими сигнал к апоптозу. Известно, что классическим вариантом специфических рецепторов для инициации апоптоза является суперсемейство TNF-рецепторов. Действительно, окислительный стресс в условиях эксперимента и при остром воспалении приводит к увеличению количества TNF-R1-положительных клеток в культурах мононуклеарных лейкоцитов. Это является весомым доказательством возможности запуска летальной программы мононуклеарных лейкоцитов по TNF α -опосредованному пути при нарушении окислительного метаболизма.

Избыточная АФК-продукция способна вызывать повреждение ДНК с последующей активацией гена *p53*, приводящей к различным эффектам: запуску ядерного пути апоптоза, репарации ДНК, аресту клеточного деления и старению клетки. При этом, согласно количественной модели, реализация того или иного варианта клеточного ответа зависит от уровня экспрессии *p53*. Установлено также, что процесс усиления апоптотической гибели за счет ядерного пути ее запуска при окислительном стрессе характеризуется активацией *p53* (в частности, при воздействии перекиси водорода в мононуклеарных лейкоцитах появляется несвязанная форма *p53* и увеличивается содержание фосфорилированного *p53*).

Активация различных путей запуска программы апоптотической гибели мононуклеарных лейкоцитов в условиях окислительного стресса обусловлена изменением функционального состояния редокс-чувствительных систем внутриклеточной регуляции апоптоза. К числу последних относятся митогенактивируемые протеинкиназы JNK и p38, фосфорилирующие ответственные за реализацию летальной программы клетки белки-мишени, в том числе факторы транскрипции NF- κ B, AP-1 и p53.

Активация JNK при стрессовых воздействиях приводит к инициации программы апоптоза клеток. Данная функция JNK связана с фосфорилированием и активацией транскрипционного фактора p53. Киназа p38 также вызывает фосфорилирование p53, активируя, помимо этого, фактор NF- κ B и MEK2C. Активируемые киназами транскрипционные факторы, в свою очередь, контролируют синтез ключе-

вых белков-регуляторов апоптоза. Однако в ряде случаев MAP-киназы JNK и p38 выполняют антиапоптотическую функцию, зависящую от характера инициирующих сигналов, взаимодействия сигнальных апоптогенных путей и типа клеток. Неоднозначность роли стрессактивируемых протеинкиназ JNK и p38 в реализации летальной программы клеток при окислительном стрессе явилась основанием для ее детализации.

В связи с этим значительный интерес представляла оценка реализации программы апоптоза мононуклеарных лейкоцитов при окислительном стрессе в присутствии селективных ингибиторов киназ JNK и p38 (SP600125 и ML3403, соответственно). Установлено, что последние предотвращают увеличение числа апоптотических клеток, характерное для перекись-индуцированного окислительного стресса, и снижают их содержание в культурах клеток, полученных у пациентов с острым воспалением. На основании этого было высказано предположение, что в условиях дисбаланса окислительного метаболизма в мононуклеарных лейкоцитах MAP-киназы JNK и p38 выполняют апоптогенную функцию.

Идентификация молекулярных механизмов данного явления сопряжена с решением вопроса о том, связана ли функция JNK и p38 в мононуклеарных лейкоцитах с возрастанием уровня их активных (фосфорилированных) форм, активирующих другие элементы апоптогенной сигнальной системы (факторы транскрипции, белки-регуляторы апоптоза). Действительно, было определено, что содержание фосфорилированных форм JNK и p38 при окислительном стрессе *in vitro* и в случае острых воспалительных заболеваний увеличивается по сравнению с контролем.

Вместе с тем при окислительном стрессе, индуцированном добавлением H_2O_2 в концентрации 1 ммоль в культуру интактных клеток, а также в клинике острого воспаления общее содержание JNK (подклассы JNK1 и JNK2) и p38 не изменялось по сравнению с контролем. Данный факт позволил сделать вывод о том, что возрастание уровня фосфорформ редокс-чувствительных киназ JNK и p38 обусловлено активацией процесса их фосфорилирования в условиях избыточной продукции АФК и не связано с увеличением экспрессии данных ферментов в клетке.

АФК-индуцируемая активность JNK и p38 MAPK участвует в формировании клеточного ответа на стресс, и различные эффекты данных киназ могут опосредованно влиять на реализацию летальной программы. В указанном контексте особый интерес представляло участие JNK и p38 MAPK в продукции цитокинов мононуклеарными

лейкоцитами в условиях дисбаланса окислительного метаболизма. В частности, выявлено участие редокс-чувствительной JNK в увеличении содержания IL-8 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов у больных острым воспалением и в случае экспериментального окислительного стресса. Возрастание продукции IL-8 при окислительном стрессе, обусловленное NF-κB-зависимой индукцией промотора гена *IL-8*, может служить косвенным признаком активации этого транскрипционного фактора, также участвующего в апоптозе.

Важнейшими про- и антиапоптогенными сигнальными молекулами, активирующимися MAP-киназами или АФК непосредственно, являются транскрипционные факторы. В частности, активное участие в реализации летальной программы принимает p53, также действующий как эффекторный проапоптогенный белок. При экспериментальном окислительном стрессе в мононуклеарных лейкоцитах крови у здоровых доноров обнаружено появление не связанного с ингибитором p53, а также активация его фосфорилирования. Последнее может претовращаться селективными ингибиторами MAP-киназ, свидетельствуя об участии p53 в редокс-чувствительных механизмах запуска апоптоза. В частности, p53 способен трансактивировать гены, кодирующие проапоптотический белок Bax семейства Bcl-2. Помимо этого, перемещение p53 к митохондриям, где он связывает антиапоптотические протеины (Bcl-2, Bcl-X_L), приводит к снижению трансмембранного митохондриального потенциала и выходу апоптогенных факторов в цитозоль. Другие протеины, активируемые с помощью p53 (NOXA, PUMA и Bid), инактивируют антиапоптотические белки семейства Bcl-2, способствуя запуску апоптоза.

Редокс-чувствительный транскрипционный фактор NF-κB участвует в регуляции иммунного ответа, воспалительной реакции, а также в контроле клеточного деления и апоптоза. NF-κB осуществляет транскрипционный контроль антиапоптотических генов *bcl-X_L*, *X-IAP*, *c-IAP1* и *c-IAP*. Установлено, что свободная форма p65 субъединицы NF-κB возникает в мононуклеарных клетках при индукции окислительного стресса перекисью водорода, а также в случае острого воспаления. Данный факт свидетельствует о высвобождении NF-κB из комплекса с ингибитором IκB (первый этап активации транскрипционного фактора) в условиях повышенной продукции АФК.

Кроме того, определено, что при экспериментальном окислительном стрессе в мононуклеарных лейкоцитах крови появляются не связанные с ингибитором p53 и NF-κB, обладающие взаимоисключающими функциями при регуляции апоптоза. Вместе с тем результирующим эффектом активации p53 и NF-κB является повышение

апоптотической реакции клеток. Как известно, начальная фаза функционирования факторов транскрипции — их высвобождение из комплекса с ингибитором. Далее транскрипционный фактор перемещается из цитоплазмы в ядро, при этом возможны модификации, приводящие к изменению его транскрипционного потенциала. Исходя из этого, анализ транскрипционной активности NF-κB и p53 может осуществляться на основе оценки ответа генов-мишеней. Одним из генов, являющихся мишенью NF-κB, считается *bcl-X_L* (кодирующий белок с антиапоптотической функцией), а мишенью p53 — ген проапоптотического белка *Bax*, относящийся, как и *Bcl-X_L*, к семейству *Bcl-2*.

Оказалось, что при окислительном стрессе *in vitro* и остром воспалении в мононуклеарных лейкоцитах повышен уровень экспрессии мРНК гена *bcl-x_L*. Данный факт позволяет сделать вывод об индукции антиапоптотических генов-мишеней при активации NF-κB. Тем не менее избыточная продукция АФК мононуклеарными лейкоцитами была сопряжена с активацией их летальной программы, и содержание белка *Bcl-X_L* в условиях окислительного стресса относительно контроля не изменялось. Последнее обстоятельство нашло объяснение с позиции посттрансляционной модификации *Bcl-X_L*, приводящей к изменению его нативной структуры и функции. Кроме того, при экспериментальном окислительном стрессе и остром воспалении обращало на себя внимание отсутствие изменения уровня экспрессии мРНК гена *bcl-2* и содержания белкового продукта данного гена в мононуклеарных лейкоцитах по сравнению с контролем. Было установлено, что возрастание содержания антиапоптотического *Bcl-2* в клетках в условиях окислительного стресса блокируется MAPK-опосредованными механизмами.

Оценка уровня экспрессии мРНК гена *bax* выявила увеличение исследованного параметра при окислительном стрессе *in vitro* и в случае острого воспаления по сравнению с таковым в интактной культуре. Поскольку ген *bax* является мишенью транскрипционного фактора p53, полученные данные подтверждают эффективность трансактивационной функции p53 в условиях избыточной продукции АФК. Отсутствие различий экспрессии *bax* при окислительном стрессе *in vitro* и при остром воспалении может свидетельствовать о едином механизме активации p53 в обоих случаях, несмотря на отсутствие белка p53 (возможно, за счет его связывания с MDM2) в мононуклеарных лейкоцитах у пациентов с внебольничной пневмонией. Уровень проапоптогенного белка *Bax* в условиях окислительного стресса также возрастал. По собственным данным, в этот процесс вовлечены редокс-чувствительные MAPK-опосредованные механизмы. Известно, что *Bax* содействует запуску запрограммированной клеточной гибели благодаря своей способности

олигомеризоваться и формировать поры в мембранах. Отсутствие адекватного увеличения содержания в клетках антисуицидальных белков Bcl-X_L и Bcl-2 при возрастании уровня проапоптотического белка Вах в ответ на апоптогенный стимул при экспериментальном окислительном стрессе может быть причиной повышения количества аннексин-положительных мононуклеарных лейкоцитов.

В целом в ходе проведенного исследования оценены редокс-чувствительные элементы сигнальной трансдукции апоптогенных сигналов мононуклеарных лейкоцитов в условиях окислительного стресса. Установлено, что в условиях дисбаланса окислительного метаболизма важную роль в реализации летальной программы клеток играют MAP-киназы JNK и p38. Активация факторов транскрипции NF-κB и p53 (за счет их фосфорилирования MAP-киназами и (или) воздействия АФК) приводит к изменению уровня экспрессии генов, кодирующих белки-регуляторы апоптоза семейства Bcl-2. Последние играют решающую роль в выборе клеточного ответа при окислительном стрессе. Данные протеины могут изменять свою активность в результате взаимодействия друг с другом, под влиянием вышестоящих компонентов редокс-чувствительных сигнальных систем, а также окислительной модификации. Наряду с этим АФК выступают в роли вторичных мессенджеров, опосредующих активацию ключевых белков-регуляторов апоптоза (рис. 32).

Результаты исследования свидетельствуют о схожести молекулярных механизмов реализации апоптоза при моделировании окислительного стресса в условиях *in vitro* и в случае острого воспаления, что позволяет интерпретировать их как типовые нарушения. Однако получение обобщающих положений о закономерностях реагирования компонентов клеточных систем при типовых патологических процессах важно не только для понимания законов их развития, но и для разработки методологии коррекции, осуществляемой на клеточном и молекулярном уровнях. Последнее зависит от знания молекулярных механизмов дисбаланса про- и антиапоптогенных факторов, являющихся мишенью действия различных повреждающих агентов.

Идентифицированные редокс-чувствительные элементы внутриклеточных сигналпередающих систем, участвующих в модуляции программы апоптоза при окислительном стрессе, могут выступать в качестве молекулярных мишеней для терапевтической коррекции нарушений летальной программы.

Полученные данные в дальнейшем послужат основой для разработки способов управления программированной гибелью клетки при патологиях, сопровождающихся дисбалансом окислительного метаболизма,

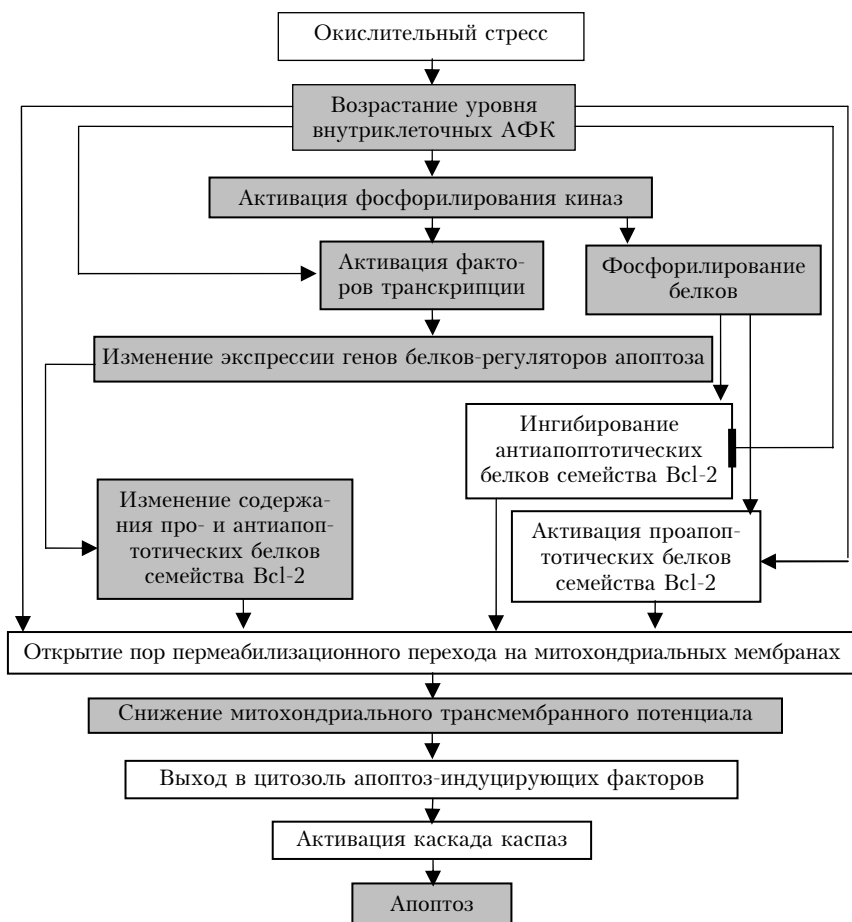


Рис. 32. Роль элементов внутриклеточной сигнальной трансдукции в механизмах дисрегуляции апоптоза при окислительном стрессе (по данным G.L. Johnson, R. Lapadat, 1998; J.K. Sax и соавт., 2002; J.J. Haddad, 2002; J. Kucharczak и соавт., 2003; С.Р. Baines, J.D. Molkenint, 2005; М.Т. Lin, М.Ф. Beal, 2006, и результатам собственных исследований (выделено))

с применением молекул, опосредованно регулирующих функцию про- и антиапоптогенных сигнальных систем. Это позволит повысить эффективность существующих методов патогенетической терапии большого числа социально-значимых заболеваний, характеризующихся дисрегуляцией клеточной гибели.

Литература

1. *Агол В.И.* Генетически запрограммированная смерть клетки // Сорос. образоват. журн. 1996. № 6. С. 20–24.
2. *Активированные* кислородные метаболиты в монооксигеназных реакциях / В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, Н.К. Зенков и др. // Бюл. СО РАМН. 2005. Т. 118. № 4. С. 7–13.
3. *Андреев А.Ю., Кушнарёва Ю.А., Старков А.А.* Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях // Биохимия. 2005. Т. 70. Вып. 2. С. 246–264.
4. *Антиоксиданты* и атеросклероз: Критический анализ проблемы и направление дальнейших исследований / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, А.И. Каминный и др. // Патогенез. 2004. № 1. С. 71–86.
5. *Апоптоз* и пролиферация как альтернативные формы ответа Т-лимфоцитов на стимуляцию / М.Ф. Никонова, М.М. Литвина, М.И. Варфоломеева и др. // Иммунология. 1999. № 2. С. 20–23.
6. *Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В.* Иммунологические проблемы апоптоза. М.: Эдиториал УРСС, 2002. 320 с.
7. *Белецкий И.П., Сорокина О.В., Никонова Л.В.* Генная терапия на основе системы Fas-антиген–Fas-лиганд // Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии. 1999. № 4. С. 40–46.
8. *Белецкий И.П., Мошникова А.Б., Прусакова О.В.* Пути передачи цитотоксического сигнала рецепторами семейства TNF-Rs (обзор) // Биохимия. 2002. Т. 67. Вып. 3. С. 343–353.
9. *Белушкина Н.Н., Хасан Хамад А., Северин С.Е.* Молекулярные основы апоптоза // Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии. 1998. № 4. С. 15–23.
10. *Белушкина Н.Н., Северин С.Е.* Молекулярные основы патологии апоптоза // Арх. патологии. 2001. № 1. С. 51–59.
11. *Бимодальное* действие экзогенной перекиси водорода на нейтрофилы человека: цитотоксический эффект и модуляция кислородного взрыва в ответ на агонист / Е.А. Пучнина, А.Н. Леденев, В.Р. Музыкантов и др. // Биохимия. 1992. Т. 57. Вып. 2. С. 694–700.
12. *Болдырев А.А.* Дискриминация между апоптозом и некрозом под влиянием окислительного стресса // Биохимия. 2000. Т. 5. Вып. 7. С. 981–991.
13. *Болдырев А.А.* Карнозин и защита тканей от окислительного стресса. М.: Изд-во «Диалог-МГУ», 1999. 364 с.
14. *Болдырев А.А., Юнева М.О.* Новые подходы к исследованию жизни и смерти нейрональной клетки // Сорос. образоват. журн. 2004. Т. 8. № 2. С. 7–14.

15. *Болдырев А.А.* Окислительный стресс // Сорос. образоват. журн. 2001. Т. 7. № 4. С. 21–28.
16. *Брюне Б., Сандау К., фон Кнетен А.* Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути // Биохимия. 1998. Т. 63. № 7. С. 966–975.
17. *Бурлакова Е.Б.* Блеск и нищета антиоксидантов // Наука и жизнь. 2006. № 2. С. 37–43.
18. *Бурова Е.Б., Гончар И.В., Никольский Н.Н.* Активация транскрипционных факторов STAT1 и STAT3 при окислительном стрессе и в клетках A431 включает SRC-зависимую трансактивацию рецептора EGF // Цитология. 2003. Т. 45. № 5. С. 466–476.
19. *Веденов А.А.* Моделирование элементов мышления. М.: Наука, 1988. 108 с.
20. *Взаимодействие* ферритина и миоглобина как индукторов перекисного окисления липидов, роль активных форм кислорода и азота / И.В. Заббарова, К.Б. Шумаев, А.Ф. Ванин и др. // Биофизика. 2004. Т. 49. С. 659–665.
21. *Владимиров Ю.А.* Свободные радикалы в биологических системах // Сорос. образоват. журн. 2000. Т. 6. № 12. С. 13–19.
22. *Владимиров Ю.А.* Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестник РАМН. 1998. № 7. С. 43–51.
23. *Владимирская Е.Б., Масчан А.А., Румянцев А.Г.* Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста // Гематология и трансфузиология. 1997. Т. 42. № 5. С. 4–9.
24. *Владимирская Е.Б.* Биологические основы точечной терапии при онкологических заболеваниях // Вопр. гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2004. Т. 3. № 4. С. 5–13.
25. *Властулос С., Зумпурлис В.С.* JNK: ключевой модулятор внутриклеточной сигнальной системы // Биохимия. 2004. Т. 69. Вып. 8. С. 1038–1050.
26. *Войков В.Л.* Био-физико-химические аспекты старения и долголетия // Успехи геронтологии. 2002. Т. 3. Вып. 9. С. 261–268.
27. *Войков В.Л.* Благотворная роль активных форм кислорода // «МИС-РТ». 2001. № 24. С. 1.
28. *Выявление* возможных механизмов повышения содержания растворимых рецепторов цитокинов sIL-4R, sIL-6R, sTNF-RI, sTNF-RII в крови здоровых доноров и онкологических больных / Н.Ю. Анисимова, А.Р. Тугуз, И.В. Чикилева и др. // Иммунология. 2003. № 2. С. 80–82.
29. *Гамалей И.А., Клыбин И.В.* Перекись водорода как сигнальная молекула // Цитология. 1996. Т. 38. № 12. С. 1233–12470.
30. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
31. *Гольдштейн Н.* Активные формы кислорода как жизненно необходимые компоненты воздушной среды // Биохимия. 2002. Т. 67. Вып. 2. С. 194–204.
32. *Гордеева А.В., Лабас Ю.А.* Одноклеточные альтруисты // Природа. 2005. № 6. С. 27–34.
33. *Гуревич К.Г., Шимановский Н.Л.* Оксид азота: биосинтез, механизмы действия, функции // Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии. 2000. № 4. С. 16–22.
34. *Гусев Н.Б.* Протеинкиназы: строение, классификация, свойства и биологическая роль // Сорос. образоват. журн. 2000. Т. 6. № 12. С. 4–13.

35. Гусев Н.Б., Букач О.В. Структура, свойства и возможная физиологическая роль малого белка теплового шока с молекулярной массой 20 кДа // Биохимия. 2005. Т. 70. Вып. 6. С. 762–772.
36. Гусев Н.Б., Богачева Н.В. Структура и свойства малых белков теплового шока и их взаимодействие с белками цитоскелета // Биохимия. 2002. Т. 67. Вып. 5. С. 613–623.
37. Дамбаева С.В., Мазуров Д.В., Пинегин Б.В. Оценка продукции активных форм кислорода методом лазерной проточной цитометрии в клетках периферической крови человека // Иммунология. 2001. № 6. С. 58–61.
38. Дас Д.К., Молик Н. Превращение сигнала гибели в сигнал выживания при редокс-сигнализации // Биохимия. 2004. Т. 69. Вып. 1. С. 16–24.
39. Действие моноклональных антител к интерлейкину-10 на пролиферативный ответ Т-лимфоцитов от уровня апоптоза в культурах мононуклеарных клеток пуповинной крови новорожденных / И.Е. Рубцова, И.Е. Лебедева, Е.А. Грачева и др. // Иммунология. 2004. № 1. С. 16–20.
40. Доманский А.В., Лапшин Е.А., Заводник И.Б. Окислительные процессы, индуцируемые органической гидроперекисью в эритроцитах человека: хемолуминесцентные исследования // Биохимия. 2005. Т. 70. Вып. 7. С. 922–932.
41. Дорохов Е.В., Белушкина Н.Н. Апоптоз в нервных клетках и его роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний // Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии. 2006. № 3. С. 46–51.
42. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // Вопр. мед. химии. 2001. Т. 47. № 6. С. 561–581.
43. Жукова О.Б., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Апоптоз и вирусная инфекция. Томск: Изд-во ТГУ, 2006. 142 с.
44. Залесский В.Н., Великая Н.В. Механизмы цитотоксических эффектов активных молекул кислорода и развитие апоптоза. К.: Витус, 2004. 25 с.
45. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. 343 с.
46. Зоров Д.Б., Банникова С.Ю. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота // Биохимия. 2005. Т. 70. Вып. 2. С. 265–272.
47. Игонин А.А., Кукес В.Г., Пальцев М.А. Сепсис: молекулярные механизмы системного воспаления в качестве модели для изучения перспективных терапевтических мишеней // Молекуляр. медицина. 2004. № 2. С. 3–11.
48. Казначеев К.С. Механизмы развития цитокининдуцированного апоптоза // Гематология и трансфузиология. 1999. Т. 44. № 1. С. 40–43.
49. Карнозинсодержащий комплекс «Биокуратор» в косметике / Э.И. Мухтаров, Н.А. Михайлова, С.Э. Мухтарова и др. // Сырье и упаковка. 2004. Т. 46. № 7. С. 12–15.
50. Компоненты неферментативной антиоксидантной системы у больных инсулин-независимым сахарным диабетом / И.В. Луста, А.В. Ситожевский, И.В. Хавалкин, Е.А. Ивановский // Биоантиоксидант. Тюмень: Изд-во Тюмен. гос. ун-та, 1997. С. 99–100.
51. Крыжановский Г.Н. Дисрегуляционная патология // Патол. физиология и эксперим. терапия. 2002. № 3. С. 2–19.

52. *Крыжановский Г.Н.* Дисрегуляционная патология // Патогенез. 2004. № 1. С. 21–29.
53. *Кузнецов С.В.* Причины гибели животных при отравлении перекисью водорода // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1993. № 6. С. 596–598.
54. *Кулинский В.И.* Активные формы кислорода и окислительная модификация макромолекул // Сорос. образоват. журн. 1999. № 1. С. 2–7.
55. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высш. шк., 1980. 296 с.
56. *Лебедев В.В.* Супероксидная теория патогенеза и терапии иммунных расстройств // Вестн. РАМН. 2004. С. 34–40.
57. *Лильин Е.Т., Иващицкая И.Н.* Роль гипоксии как пускового механизма апоптоза при некоторых неврологических заболеваниях у детей // Вопр. соврем. педиатрии. 2003. Т. 2. № 5. С. 74–79.
58. *Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика* / Под ред. Дж. Натвиг и др. М.: Медицина, 1980. 280 с.
59. *Лушиников Е.Ф., Абросимов Л.Ю.* Гибель клетки (апоптоз). М.: Медицина, 2001. 192 с.
60. *Лю Б.Н.* Кислородно-перекисная концепция апоптоза и возможные варианты его механизма // Успехи соврем. биологии. 2001. Т. 121. № 5. С. 488–501.
61. *Маеда Х., Акаике Т.* Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке // Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 7. С. 1007–1019.
62. *Мазуренко Н.Н.* Роль вирусов папиллом в канцерогенезе шейки матки // Актуал. вопр. клинич. онкологии. 2003. Т. 5. № 1. С. 34–42.
63. *Маянский А.Н., Маянский Д.Н.* Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, 1989. 221 с.
64. *Маянский Н.А.* Каспазозависимый механизм апоптоза нейтрофилов: апоптогенный эффект TNF- α // Иммунология. 2002. № 1. С. 15–17.
65. *Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др.* Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 503 с.
66. *Митохондрии* в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели / М. Бра, Б. Квинан, С.А. Сузин и др. // Биохимия. 2005. Т. 70. Вып. 2. С. 284–293.
67. *Моргункова А.А.* Семейство генов p53: контроль клеточной пролиферации и программа развития организма // Биохимия. 2005. Т. 70. Вып. 9. С. 1157–1176.
68. *Мураков С.В., Воспелыникова Н.Д.* Митохондриальные мегапоры в жизни клетки // Вопр. биол. и фарм. химии. 2006. № 2. С. 42–50.
69. *Невницкий Л.А.* Программированная гибель клеток и апоптоз: значение для развития и функционирования иммунной системы // Вестн. РАМН. 1998. № 6. С. 43–50.
70. *Новиков В.С.* Программированная клеточная гибель / Под ред. В.С. Новикова. СПб., 1996. 276 с.
71. *Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Жукова О.Б.* Молекулярные основы дисрегуляции программированной гибели лимфоцитов при хронической вирусной инфекции // Бюл. сиб. медицины. 2006. Т. 5. № 2. С. 23–31.
72. *Новицкий В.В., Степовая Е.А., Батухин А.В.* Характеристика состояния мембран эритроцитов больных со злокачественными новообразованиями по данным флуоресцентного зондирования // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1999. Т. 128. № 8. С. 226–229.

73. Оксид азота в неопластическом процессе / С.Я. Проскуряков, А.Г. Конопляников, А.И. Иванников и др. // *Вопр. онкологии*. 2001. Т. 47. № 3. С. 257–269.
74. *Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В.* Редокс-регуляция клеточных функций // *Биохимия*. 2007. Т. 72. Вып. 2. С. 158–174.
75. *Особенности* состояния мембран и метаболизма эритроцитов у больных раком легкого / Е.А. Степовая, В.В. Новицкий, В.Е. Гольдберг и др. // *Вопр. онкологии*. 2004. Т. 50. № 1. С. 63–67.
76. *Пальцев М.А.* Введение в молекулярную медицину. М.: Медицина, 2004. 496 с.
77. *Панасенко О.М., Чеканов А.В.* Образование свободных радикалов при распаде гидропероксида в присутствии миелопероксидазы или активированных нейтрофилов // *Биохимия*. 2005. Т. 70. Вып. 9. С. 1209–1217.
78. *Пасечник А.В., Фролов В.А.* Апоптоз нейтрофилов как параметр воспалительной реакции при патологии // *Вестн. РУДН. Сер. Медицина*. 2004. Т. 25. № 1. С. 103.
79. *Пасечник И.Н.* Окислительный стресс и критические состояния у хирургических больных // *Вестн. интенсив. терапии*. 2004. № 3. С. 27–30.
80. *Перекисное* окисление липопротеинов крови человека, индуцированное гипохлорит-анионом / С.А. Евгина, О.Н. Панасенко, В.И. Сергиенко и др. // *Биол. мембраны*. 1992. Т. 9, № 9. С. 946–953.
81. *Перекись* водорода в субтоксических концентрациях активирует фосфоинозитидный обмен в эндотелиальных клетках человека / В.Р. Музыкантов, Е.А. Пучнина-Артюшенко, Е.В. Чекнева и др. // *Биол. мембраны*. 1992. Т. 9. № 2. С. 133.
82. *Перекись* водорода в субтоксических концентрациях активирует фосфоинозитидный обмен в эндотелиальных клетках человека / В.Р. Музыкантов, Е.А. Пучнина-Артюшенко, Е.В. Чекнева и др. // *Биол. мембраны*. 1992. Т. 9. № 2. С. 133.
83. *Пероксид* водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптозного сигнала от клетки к клетке / О.Ю. Плетюшкина, Е.К. Фетисова, К.Г. Лямзаев и др. // *Биохимия*. 2006. Т. 71. Вып. 1. С. 75–84.
84. *Петрович Ю.А., Гуткин Д.В.* Свободнорадикальное окисление и его роль в патогенезе воспаления, ишемии и стресса // *Патол. физиол. и эксперим. терапия*. 1989. № 5. С. 85–92.
85. *Петухов В.И.* Роль Fas-опосредованного апоптоза в реализации противоопухолевого эффекта α -интерферона при хроническом миелолейкозе // *Гематология и трансфузиология*. 2000. Т. 45. № 4. С. 29–33.
86. *Потапов М.П.* Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // *Иммунология*. 2002. № 4. С. 237–243.
87. *Потехина Е.С., Надеждина Е.С.* Митоген-активируемые протеинкиназные каскады и участие в них Ste20-подобных протеинкиназ // *Успехи биол. химии*. 2002. Т. 42. С. 235–256.
88. *Проскуряков С.Я., Габай В.Л.* Некроз-активная, управляемая форма программируемой клеточной гибели // *Биохимия*. 2002. Т. 67. Вып. 4. С. 467–491.
89. *Реброва Т.Ю., Маслов Л.Н., Там С.В.* Вклад системы антиокислительных ферментов в реализацию кардиопротекторного эффекта опиоидов при окислительном стрессе // *Вопр. мед. химии*. 2001. № 3. С. 55–58.

90. *Регистрация* блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови как экспресс-метод оценки тяжести состояния больных осложненными формами гипертонической болезни / А.И. Инжутова, А.Б. Салмина, М.М. Петрова и др. // Бюл. СО РАМН. 2007. Т. 123. № 1. С. 6–10.
91. *Роль* иммунофенотипических и цитогенетических изменений лимфоцитов крови в механизмах хронизации вирусной инфекции / Н.В. Рязанцева, О.Б. Жукова, В.В. Новицкий и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2003. № 6. С. 23–27.
92. *Роль* НАД(Ф)Н-оксидазы в регуляции уровня пролиферативного ответа лимфоцитов на митоген / О.М. Перминова, В.В. Сенюков, Н.Н. Вольский и др. // Иммунология. 2005. № 6. С. 42–51.
93. *Роль* процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных болезней / А.П. Шепелев, И.В. Корниенко, А.В. Шестопалов, А.Ю. Антипов // Вопр. мед. химии. 2000. № 2. С. 54–59.
94. *Роль* системы Fas/FasL в индукции апоптоза гепатоцитов при хронических вирусных гепатитах / Е.В. Дмитриева, Е.Ю. Москалёва, Е.А. Коган и др. // Арх. патологии. 2003. № 3. С. 43–46.
95. *Роль* СОД в патогенезе бокового амиотрофического склероза / М.Н. Захарова, И.А. Завалишин, А.А. Болдырев и др. // Бюл. эксперим. биол. медицины. 1999. Т. 127. С. 460–462.
96. *Рубцова И.Е., Лебедева И.Е.* Действие моноклональных антител к интерлейкину-10 на пролиферативный ответ Т-лимфоцитов зависит от уровня апоптоза в культурах мононуклеарных клеток пуповинной крови новорожденных // Иммунология. 2004. № 1. С. 16–20.
97. *Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.М.* Программируемая клеточная смерть // Биохимия. 2000. Т. 65. Вып. 8. С. 1029–1046.
98. *Система* Fas-FasL в норме и при патологии / С.Г. Аббасова, В.М. Липкин, Н.Н. Трапезников и др. // Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии. 1999. № 3. С. 3–14.
99. *Скулачев В.П.* Кислород в живой клетке: Добро и зло // Сорос. образоват. журн. 1996. № 3. С. 4–16.
100. *Скулачев В.П.* H₂O₂ сенсоры легких и кровеносных сосудов и их роль в антиоксидантной защите организма // Биохимия. 2001. Т. 66. Вып. 10. С. 1425–1429.
101. *Скулачев В.П.* Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // Сорос. образоват. журн. 2001. Т. 7. № 6. С. 4–10.
102. *Состояние* системы перекисного окисления липидов у больных ишемической болезнью сердца / В.А. Барсель, И.С. Шедрина, В.Д. Вахляев и др. // Кардиология. 1998. № 5. С. 18–20.
103. *Степанов Ю.М., Фильченков А.А., Кушинский Н.Е.* Система Fas/Fas-лиганд. Дн.: ДИА, 2000. 48 с.
104. *Талаева В.В.* Механизмы взаимодействия клеток крови и сосудистой стенки в реализации воспалительного и иммунного ответов // Укр. ревматол. журн. 2001. № 3. С. 45–53.

105. Ткаченко А.Г., Федотова М.В. Зависимость защитных функций полиаминов *Escherichia coli* от стрессорных воздействий супероксидных радикалов // Биохимия. 2007. Т. 72. Вып. 1. С. 128–136.
106. Тодоров И.Н. Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологий, процессе старения и апоптозе // Рос. хим. журн. 2007. № 1. С. 97–103.
107. Тронов В.А., Константинов Е.М. Репарация ДНК и гибель покоящихся лимфоцитов крови человека, индуцированные перекисью водорода // Биохимия. 2000. Т. 65. Вып. 11. С. 1516–1524.
108. Тронов В.А., Константинов Е.М. Роль экзистивных механизмов репарации ДНК в индукции апоптоза // Биохимия. 2002. Т. 67. Вып. 7. С. 882–889.
109. Турпаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов // Биохимия. 2002. Т. 67. Вып. 3. С. 339–352.
110. Фильченков А.А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций // Биохимия. 2003. Т. 68. Вып. 4. С. 453–463.
111. Фрейдлин И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции // Иммунология. 2001. № 5. С. 4–15.
112. Фукузава К., Козуре Е. Увеличение образования оксида азота и супероксида под действием сукцината α -токоферола, его способность вызывать апоптоз и противораковые свойства // Биохимия. 2004. Т. 69. Вып. 1. С. 64–73.
113. Хансон К.П. Программированная клеточная гибель (апоптоз) молекулярные механизмы и роль в биологии и медицине // Биохимия. 1997. Т. 61. Вып. 7. С. 402–412.
114. Хегай М.Д., Зайчик С.Е. Перекисное окисление липидов и гликозилирование белков в аорте кроликов с аллоксановым диабетом при инсулинокоррекции // Патол. физиология и эксперим. терапия. 1995. № 4. С. 6–7.
115. Чекановская Л.А., Генералов А.В. Влияние препарата гамма-плант на продукцию ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 мононуклеарами периферической крови человека *in vitro* // Вопр. мед. химии. 2001. № 2. С. 73–82.
116. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Механизмы структурной и функциональной дезорганизации биосистем под влиянием свободных радикалов // Фундаментальные исследования. 2007. № 4. С. 7–18.
117. Чумаков П.М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью // Биохимия. 2000. Т. 65. Вып. 1. С. 34–47.
118. Шемарова И.В. Роль протеинкиназных каскадов в передаче стрессовых сигналов в клетках низших эукариот // Цитология. 2006. Т. 48. № 2. С. 95–113.
119. Шоф Н.Ф., Каган В.Е. Использование окислительного стресса и механизма передачи сигналов при лечении новообразований, устойчивых к химиотерапии // Биохимия. 2004. Т. 69. Вып. 1. С. 48–56.
120. Ярилин А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах // Иммунология. 1996. № 6. С. 10–23.
121. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме // Патол. физиология и эксперим. терапия 1998. № 2. С. 38–48.
122. Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // Актуальные проблемы патофизиологии / Под ред. Б.Б. Мороза. М., 2001. С. 13–56.

123. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions / T. Chittenden, C. Flemington, A.B. Houghton et al. // EMBO J. 1995. Vol. 14. P. 5589–5596.
124. A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis / Y. Deng, X. Ren, L. Yang et al. // Cell. 2003. Vol. 115. P. 61–70.
125. A novel assay for discovery and characterization of pro-apoptotic drugs and for monitoring apoptosis in patient sera / K. Biven, H. Erdal, M. Hagg et al. // Apoptosis. 2003. Vol. 8. P. 263–268.
126. A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast / E.V. Pavlov, M. Priault, D. Pietkiewicz et al. // J. Cell Biol. 2001. Vol. 155. P. 725–732.
127. A transactivation-deficient mouse model provides insights into Trp53 regulation and function / G.S. Jimenez, M. Nister, J.M. Stommel et al. // Nat. Genet. 2000. Vol. 26. P. 37–43.
128. Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene / A. Hamasaki, F. Sendo, K. Nakayama et al. // J. Exp. Med. 1998. Vol. 188. P. 1985–1992.
129. Activated T cell death in vivo mediated by pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bim / D.A. Hildeman, Y. Zhu, T.C. Mitchell et al. // Immunity. 2002. Vol. 16. P. 759–767.
130. Activation of nuclear factor κ B and Bcl-x_L survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of I κ B / N.T. Bui, A. Livolsi, J.F. Peyron et al. // J. Cell. Biol. 2001. Vol. 152. P. 753–764.
131. Activation of the NADPH oxidase in human fibroblasts by mechanical intrusion of a single cell with an ultramicroelectrode / S. Arbault, P. Pantano, N. Sojic et al. // Carcinogenesis. 1997. Vol. 18. № 3. P. 569–574.
132. Adams J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis // Genes Dev. 2003. Vol. 17. P. 2481–2495.
133. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation / N. Vahsen, C. Cande, J.J. Briere et al. // J. EMBO. 2004. Vol. 23. P. 4679–4689.
134. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF- κ B through utilization of the I κ B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38 / L.V. Madrid, M.W. Mayo, J.Y. Reuther et al. // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 18934–18940.
135. Alarcon-Vargas D., Ronai Z. p53-Mdm2-the affair that never ends // Carcinogenesis. 2002. Vol. 23. P. 541–547.
136. Analysis and clinical significance of ETV6 rearrangement in myelodysplastic syndromes patients / B.T. Ding, N.J. Guo, J.Z. Sun et al. // Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 2007. Vol. 28. № 12. P. 804–807. Chinese. PMID: 18476590 [PubMed in process].
137. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays / R. Zhao, K. Gish, M. Murphy et al. // Genes Dev. 2000. Vol. 8. P. 981–993.
138. Analysis of the pathways of nitric oxide utilization in mitochondria / E. Cadenas, J.J. Poderoso, F. Antunes et al. // Free Radic Res. 2000. № 6. P. 747–756.

139. *Andreka P., Zang J., Dougherty C. et al.* Cytoprotection by Jun kinase during nitric oxide-induced cardiac myocyte apoptosis // *Circ. Res.* 2001. Vol. 88. P. 305–312.
140. *Annexin V*-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure / M. Van Engeland, Nieland L.J.W., F.C.S. Ramaekers et al. // *Cytometry.* 1998. Vol. 31. № 1. P. 1–9.
141. *Antioxidant* and cytoprotective responses to redox stress / J. Mathers, J.A. Fraser, M. McMahon et al. // *Biochem. Soc. Symp.* 2004. Vol. 71. P. 157–176.
142. *Antioxidants*, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function / M.J. Jackson, S. Papa, J. Bolanos et al. // *Mol. Aspects Med.* 2002. Vol. 23. P. 209–285.
143. *Antonsson B.* Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family «killer-proteins» and their victim the mitochondrion // *Cell Tissue Res.* 2001. Vol. 306. № 3. P. 347–361.
144. *Apaf-1* is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis / A.I. Robles, N.A. Bemmels, A.B. Foraker, C.C. Harris // *Cancer Res.* 2001. Vol. 61. P. 6660–6664.
145. *Apoptosis* and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis / M. Chawla-Sarkar, D.J. Lindner, Y.-F. Liu et al. // *Apoptosis.* 2003. Vol. 8. P. 237–249.
146. *Apoptosis* regulator Bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant / C.G. Print, K.L. Loveland, L. Gibson et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 12424–12431.
147. *Appella E., Anderson C.W.* *Post-translational* modifications and activation of p53 by genotoxic stresses // *Eur. J. Biochem.* 2001. Vol. 268. P. 2764–2772.
148. *Armant M., Delespesse G., Sarfati M.* IL-2 and IL-7 but not IL-12 protect natural killer cells from death by apoptosis and upregulate bcl-2 expression // *Immunology.* 1995. Vol. 85. № 2. P. 331–337.
149. *Ashkenazi A., Dixit V.M.* Death receptors: signaling and modulation // *Science.* 1998. Vol. 281. P. 1305–1308.
150. *ASK1* is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis / K. Tobiume, A. Matsuzawa, T. Takahashi et al. // *EMBO Rep.* 2001. Vol. 2. P. 222–228.
151. *Association* of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release / V. Mikhailov, M. Mikhailova, K. Degenhardt et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 5367–5376.
152. *Autocrine* T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95) / J. Dhein, H. Walczak, C. Bäumler et al. // *Nature.* 1995. № 2. P. 438–441.
153. *Babior B. M.* NADPH Oxidase: An Update // *Blood.* 1999. Vol. 93. P. 1464–1476.
154. *Bad-deficient* mice develop diffuse large B cell lymphoma / A.M. Ranger, J. Zha, H. Harada et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. Vol. 100. P. 9324–9329.
155. *Baines C.P., Molkenin J.D.* Stress signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2005. Vol. 38. P. 47–62.

156. *Bax* and *Bak* can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis / W.X. Zong, C. Li, G. Hatzuvassiliou et al. // *J. Cell Biol.* 2003. Vol. 162. P. 59–69.
157. *Bax* and *Bak* coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis / A. Nechushtan, C.L. Smith, I. Lamensdorf et al. // *J. Cell Biol.* 2001. Vol. 153. P. 1265–1276.
158. *Bax* is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells / B. Antonsson, S. Montessuit, B. Sanchez et al. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 11615–11623.
159. *Bax* oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein / X. Roucou, S. Montessuit, B. Antonsson et al. // *Biochem. J.* 2002. Vol. 368. P. 915–921.
160. *Bcl-2* and *Bax* regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator / C. Brenner, H. Cadiou, H.L. Vieira et al. // *Oncogene.* 2000. Vol. 19. P. 329–336.
161. *Bcl-2* and *Bcl-X(L)* block thapsigargin-induced nitric oxide generation, c-Jun NH(2)-terminal kinase activity, and apoptosis / R.K. Srivastava, S.J. Sollott, L. Khan et al. // *Mol. Cell Biol.* 1999. Vol. 19. № 8. P. 5659–5674.
162. *Bcl-2* deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine / S. Kamada, A. Shimono, Y. Shinto et al. // *Cancer Res.* 1995. Vol. 55. P. 354–359.
163. *Bcl-2* family members and functional electron transport chain regulate oxygen-deprivation-induced cell death / D.S. McClintock, M.T. Santore, V.Y. Lee et al. // *Mol. Cell Biol.* 2002. Vol. 22. № 1. P. 94–104.
164. *Bcl-2* phosphorylation required for anti-apoptosis function / T. Ito, X. Deng, B. Carr et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 11671–11673.
165. *Bcl-2* prevents *Bax* oligomerization in the mitochondrial outer membrane / V. Mikhailov, M. Mikhailova, D.J. Pulkrabek et al. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 18361–18374.
166. *Bcl-2*, *Bcl-xL* sequester BH3 domain-only molecules preventing *Bax*- and *Bak*-mediated mitochondrial apoptosis / E.H. Cheng, M.C. Wei, S. Weiler et al. // *Mol. Cell.* 2001. Vol. 8. P. 705–711.
167. *Bcl-x* prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation / N. Motoyama, T. Kimura, T. Takahashi et al. // *J. Exp. Med.* 1999. Vol. 189. P. 1691–1698.
168. *Beere H.M.* Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways // *The Journal of Clinical Investigation.* 2005. Vol. 115. № 10. P. 695–698.
169. *Béroud C., Soussi T.* The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools // *Hum. Mutat.* 2003. Vol. 3. P. 176–181.
170. *BH3* Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate *Bax*-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly / T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, C.J. Ehipuk et al. // *Mol. Cell.* 2005. Vol. 17. P. 525–535.
171. *Bouillet P., Purton J.F., Godfrey D.I. et al.* BH3-only *Bcl-2* family member *Bim* is required for apoptosis of autoreactive thymocytes // *Nature.* 2002. Vol. 415. P. 922–9266.

172. *BH3-only* proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak // W.X. Zong, T. Lindsten, A.J. Ross et al. // *Genes Dev.* 2001. Vol. 15. P. 1481–1486.
173. *BID* regulation by p53 contributes to chemosensitivity // J.K. Sax, P. Fei, M.E. Murphy et al. // *Nat. Cell Biol.* 2002. Vol. 4. P. 842–849.
174. *Bid-deficient* mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis // X.M. Yin, K. Wang, A.A. Gross et al. // *Nature.* 1999. Vol. 400. P. 886–891.
175. *Block E*. Hydrogen peroxide alters the physical state and function of the plasma cell membrane of pulmonary artery endothelial cells // *J. Cell Physiol.* 1991. Vol. 146. P. 362–369.
176. *Bonizzi G., Karin M.* The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity // *Trends Immunol.* 2004. Vol. 25. P. 280–288.
177. *Borner C.* The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions // *Mol. Immunol.* 2003. Vol. 39. P. 615–647.
178. *Bouchier-Hayes L., Lartigue L.* Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death // *J. Clin. Invest.* 2005. Vol. 115. № 10. P. 649–652.
179. *Bredesen D.E.* Apoptosis: overview and signal transduction pathways // *J. Neurotrauma.* 2000. Vol. 17. P. 801–810.
180. *Brodie C., Blumberg P.M.* Regulation of cell apoptosis by protein kinase C δ // *Apoptosis.* 2003. Vol. 8. P. 19–27.
181. *Brookes P.S., Levonen A.L., Shiva S. et al.* Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species // *Free Radical Biol. Med.* 2002. Vol. 33. P. 755–764.
182. *Brooks C.L., Gu W.* Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003. Vol. 15. P. 164–171.
183. *Burlacu A.* Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins // *J. Cell. Mol. Med.* 2003. Vol. 7. P. 249–257.
184. *Byczkowski J.Z., Gessner T.* Biological role of superoxide ion-radical // *Int. J. Biochem.* 1998. Vol. 20. P. 569–580.
185. *Caelles A., Helmberg M.K.* p53-Dependent apoptosis is not mediated by transcriptional activation of p53-target genes // *Nature.* 1994. Vol. 370. P. 220–230.
186. *Cain K., Bratton S.B., Cohen G.M.* The APAF-1 apoptosome: a large caspase-activating complex (Review) // *Biochimie.* 2002. № 3. P. 203–214.
187. *Calcineurin* activation protects T-cells from glucocorticoid-induced apoptosis // Y. Zhao, Y. Tozawa, R. Iseki et al. // *J. Immunol.* 1995. Vol. 154. P. 6346–6354.
188. *Campbell K.J., Rocha S., Perkins N.D.* Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF- κ B // *Mol. Cell.* 2004. Vol. 13. P. 853–865.
189. *Campbell K.J., Perkins N.D.* Post-translational modification of RelA (p65) NF- κ B // *Biochem. Soc. Trans.* 2004. Vol. 32. P. 1087–1089.
190. *Campbell K.J., Perkins N.D.* Regulation of NF- κ B function // *Biochem. Soc. Symp.* 2006. Vol. 73. P. 165–180.
191. *CDK4* regulation by TNFR1 and JNK is required for NF- κ B-mediated epidermal growth control // J.Y. Zhang, S. Tao, R. Kimmel et al. // *J. Cell. Biol.* 2005. Vol. 168. P. 561–566.

192. *Cell-autonomous* Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas / T. Brunner, R.J. Mogil, D. LaFace et al. // *Nature*. 1995. № 2. P. 441–444.
193. *Ceramide* accumulation precedes caspase-3 activation during apoptosis of A549 human lung adenocarcinoma cells / T. Ravid, A. Tsaba, P. Gee et al. // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2003. Vol. 284. № 6. P. 1082–1092.
194. *Characterization* of the signal that directs Bcl-xL, but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane / T. Kaufmann, S. Schlipf, J. Sanz et al. // *J. Cell Biol.* 2003. Vol. 160. P. 53–64.
195. *Chen L., Willis S.N., Wei A. et al.* Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function // *Mol. Cell*. 2005. Vol. 17. № 3. P. 393–403.
196. *Chen L.F., Greene W.C.* Shaping the nuclear action of NF-kappa B // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004. Vol. 5. P. 392–401.
197. *Chen Q., Cong B., Almasan A.* Distinct stages of cytochrom c release from mitochondria: evidence of feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis // *Cell Death Diff.* 2000. Vol. 7. P. 227–233.
198. *Chomczynski P., Sacchi N.* Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analytical Biochemistry*. 1987. Vol. 162. P. 156–159.
199. *Chen K., Vita J.A., Berk B.C., Keaney J.F.* c-Jun N-terminal Kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves Src-dependent epidermal growth factor receptor transactivation // *J. Biological Chemistry*. 2001. Vol. 276. № 19. P. 16045–16050.
200. *CK2* is a C-terminal IκB kinase responsible for NF-κB activation during the UV response / T. Kato, M. Delhase, A. Hoffmann et al. // *Mol. Cell*. 2003. Vol. 12. P. 829–839.
201. *c-Myc* functionally cooperates with Bax to induce apoptosis / P. Juin, A. Hunt, T. Littlewood et al. // *Mol. Cell Biol.* 2002. Vol. 22. P. 6158–6169.
202. *Communal C., Colucci W.S., Singh K.* p38 mitogen-activated protein kinase pathway protects adult rat ventricular myocytes against β-adrenergic receptor-stimulated apoptosis. Evidence for Gi-dependent activation // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 19395–19400.
203. *Comparison* of HPV, p53 mutation and allelic losses in posttransplant and non-posttransplant oral squamous cell carcinomas / L. Zhang, J.B. Epstein, C.F. Poh et al. // *J. Oral Path. Med.* 2002. Vol. 31. P. 134–141.
204. *Conditional* deletion of the *Bcl-x* gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly / K.U. Wagner, E. Claudio, E.B. Rucker 3rd et al. // *Development*. 2000. Vol. 127. P. 4949–4958.
205. *Confocal* microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy / J.J. Lemasters, T. Qian, S.P. Elmore et al. // *Biofactors*. 1998. № 8. P. 283–285.
206. *Cory S., Adams J.M.* The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch // *Nat. Rev. Cancer*. 2002. Vol. 2. P. 647–656.
207. *Crabtree G.R.* Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NFAT // *Cell*. 1999. Vol. 96. P. 611–614.

208. *Cho S.D., Ahn N.S., Jung J.W. et al.* Critical role of the c-JunNH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways on sodium butyrate-induced apoptosis in DU145 human prostate cancer cells // *Eur. J. Cancer Prev.* 2006. Vol. 15. № 1. P. 57–63.
209. *Crompton M.* The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // *J. Biochem.* 1999. № 2. P. 233–249.
210. *Crucial* role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of IκB in NF-κB activation by an oxidative stress / S. Schoonbroodt, V. Ferreira, M. Best-Belpomme et al. // *J. Immunol.* 2000. Vol. 164. P. 4292–4300.
211. *c-Src* is required for oxidative stress-mediated activation of Big Mitogen-activated Protein Kinase 1(BMK1) / J. Abe, M. Takahashi, M. Ishida et al. // *J. Biological Chemistry.* 1997. Vol. 272. № 33. P. 20389–20394.
212. *Cyclic* nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in subsequent inhibition of TNFα and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages / T. Kambayashi, C.O. Jacob, D. Zhou et al. // *J. Immunol.* 1995. Vol. 155. P. 4909–4910.
213. *Cytochrome c* and dATP-dependent formation of APAF-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade / P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo et al. // *Cell.* 1997. Vol. 91. P. 479–489.
214. *Davis R.J.* MAPKs: new JNK expands the group // *Trends Biochem. Sci.* 1994. Vol. 19. P. 470–473.
215. *Davis R.J.* Signal transduction by the JNK group of MAP kinase // *Cell.* 2000. Vol. 103. P. 239–252.
216. *de Vries J.E.* Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin-10 // *Ann. Med.* 1995. Vol. 27. P. 537–541.
217. *De Zutter G.S., Davis R.J.* Pro-apoptotic gene expression mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98. № 11. P. 6168–6173.
218. *Deficiency* in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis / J.C. Rathmell, T. Lindsten, W.X. Zong et al. // *Nat. Immunol.* 2002. Vol. 3. P. 932–939.
219. *Development* and maintenance of B- and T-lymphocytes requires antiapoptotic Mcl-1 / J.T. Opferman, A. Letai, C. Beard et al. // *Nature.* 2003. Vol. 426. P. 671–676.
220. *Dickinson D.A., Iles K.E., Zhang H. et al.* Curcumin alters EpRE and AP-1 binding complexes and elevates glutamate-cysteine ligase gene expression // *FASEB J.* 2003. Vol. 17. P. 473–475.
221. *Dolmetsch R.E., Lewis R.S., Goodnow C.C., Healy J.I.* Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration // *Nature.* 1997. Vol. 386. P. 855–858.
222. *Differential* expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis / A. Yang, M. Kagdah, Y. Wang et al. // *Human Pathology.* 2002. Vol. 33. P. 158–164.
223. *Differential* regulation of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha in endothelial and epithelial cells / V. Lakshminarayanan, D.W. Beno, R.H. Costa, K.A. Roebuck // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. № 52. P. 32910–32918.

224. *Differential* regulation of monocytic tumor necrosis factor- α and interleukin-10 expression / C. Meisel, K. Vogt, C. Platzer et al. // *Eur. J. Immunol.* 1996. Vol. 26. P. 1580.
225. Differential targeting of pro-survival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function / L. Chen, S.N. Willis, A. Wei et al. // *Mol. Cell.* 2005. Vol. 17. P. 393–403.
226. *Direct* activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes / H. Aoki, P.M. Kang, J. Hampe et al. // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 10244–10250.
227. *Dissecting* p53 tumor suppressor functions *in vivo* / C.A. Schmitt, J.S. Fridman, M. Yang et al. // *Cancer Cell.* 2002. Vol. 1. P. 289–298.
228. *Distelhorst C.W., DUBYAK G.* Role of Calcium in Glucocorticosteroid-Induced Apoptosis of Thymocytes and Lymphoma Cells: Resurrection of Old Theories by New Findings // *Blood.* 1998. Vol. 91. № 3. P. 731–734.
229. *Distinct* BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics / A. Letai, M. Bassik, L. Walensky et al. // *Cancer Cell.* 2002. Vol. 2. P. 183–192.
230. *Distinct* effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- κ B and AP-1 / H. Schenk, M. Klein, W. Erdbrugger et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. Vol. 91. P. 1672–1676.
231. *Dowd D.R., Miesfeld R.L.* Evidence that glucocorticoid- and cyclic AMP-induced apoptotic pathways in lymphocytes share distal events // *Mol. Cell. Biol.* 1992. Vol. 12. P. 3600–3608.
232. *Dragovich T., Rudin C.M., Thompson C.B.* Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death // *Oncogene.* 1998. Vol. 17. P. 3207–3213.
233. *Dumaz N., Meek D.W.* p53-serine 15 phosphorylation stimulates the transactivation function of p53 but does not directly influence interaction with HDM2 // *EMBO J.* 1999. Vol. 18. P. 7002–7010.
234. *Early redistribution* of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus. Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl / S.J. Martin, C.P. Reutelingsperger, M. McGahon et al. // *J. Exp. Med.* 1995. Vol. 182. P. 1545–1557.
235. *Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H.* Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis // *Annu. Rev. Biochem.* 1999. Vol. 68. P. 383–424.
236. *Effects* of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes: comparison with IL-4 and modulation by IFN- γ or IL-10 / R. de Waal Malefyt, C.G. Figdor, R. Huijbens et al. // *J. Immunol.* 1993. Vol. 151. P. 6370–6372.
237. *el-Deiry W.S.* Regulation of p53 downstream genes. *Semin* // *Cancer Biol.* 1998. Vol. 8. P. 345–357.
238. *Elion E.* Signal transduction: routing MAP Kinase cascades // *Science.* 1998. Vol. 281. P. 1625–1626.
239. *Endogenous* reactive oxygen intermediates activate tyrosine kinases in human neutrophils / J.H. Brumell, A.L. Burkhardt, J.B. Bolen, S. Grinsiein // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 1455–1461.

240. *Epinephrine* inhibits tumor necrosis factor- α and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia / T. van der Poll, S.M. Coyle, K. Barbosa et al. // *J. Clin. Invest.* 1996. Vol. 97. P. 713–716.
241. *Ergothioneine* inhibits oxidative stress- and TNF- α -induced NF- κ B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells / I. Rahman, P.S. Gilmour, L.A. Jimenez et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. Vol. 302. № 4. P. 860–864.
242. *Extraction* and analysis of superoxide free radicals ($O_2^{\cdot-}$) from whole mammalian liver / A.R. Shoaf, A.U. Shaikh, R.D. Harbison, O. Hinojosa // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1991. Vol. 6. № 2. P. 87–96.
243. *Eynott P.R.* Effect of an inhibitor of Jun N-terminal protein kinase, SP600125, in single allergen challenge in sensitized rats // *Immunology.* 2004. Vol. 112. P. 446–453.
244. *Fan M., Goodwin M., Vu T. et al.* Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-X_L is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 29980–29985.
245. *Ferredoxin* reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells / P.M. Hwang, F. Bunz, G. Yu et al. // *Nat. Med.* 2001. Vol. 7. P. 1111–1117.
246. *Fridman J.S., Lowe S.W.* Control of apoptosis by p53 // *Oncogene.* 2003. Vol. 22. P. 930–940.
247. *From the Cover:* Antibodies have the intrinsic capacity to destroy antigens / A.D. Wentworth, L.H. Jones, P. Wentworth et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. Vol. 97. № 20. P. 10930–10935.
248. *Gallo K.A., Johnson G.L.* Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2002. Vol. 3. № 9. P. 663–672.
249. *Garg A.K., Aggarwal B.B.* Reactive oxygen intermediates in TNF signaling // *Mol. Immunol.* 2002. Vol. 39. P. 509–517.
250. *Garrington T.P., Johnson G.L.* Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999. Vol. 11. P. 211–218.
251. *Genome-wide* comparison of human keratinocyte and squamous cell carcinoma responses to UVB irradiation: implications for skin and epithelial cancer / J.E. Dazard, H. Gal, N. Amariglio et al. // *Oncogene.* 2003. Vol. 22. P. 2993–3006.
252. *Go N.F., Castle B.E., Barrett R. et al.* Interleukin-10, a novel B-cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosomelinked immunodeficiency B-cells // *J. Exp. Med.* 1990. Vol. 172. P. 1625–1631.
253. *Gopala K.R., Jaken S.* Protein kinase C signaling and oxidative stress // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. Vol. 28. P. 1349–1361.
254. *Gottlieb R.A.* Mitochondria: execution central // *FEBS Lett.* 2000. Vol. 482. P. 6–12.
255. *Green D.R., Evan G.I.* A matter of life and death // *Cancer Cell.* 2002. № 1. P. 19–30.
256. *Green D.R., Reed J.C.* Mitochondria and apoptosis // *Science.* 1998. Vol. 281. P. 1309–1312.

257. *Green D.R., Kroemer G.* The pathophysiology of mitochondrial cell death // *Science*. 2004. Vol. 305. P. 626–629.
258. *Growth* factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis // *J.J. Lum, D.E. Bauer, M. Kong et al.* // *Cell*. 2005. Vol. 120. P. 237–248.
259. *Guardians* of cell death: the Bcl-2 family proteins // *P.T. Daniel, K. Schulze-Osthoff et al.* // *Essays Biochem.* 2003. Vol. 39. P. 73–88.
260. *Gudkov A.V., Komarova E.A.* The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy // *Nat. Rev. Cancer*. 2003. Vol. 3. P. 117–129.
261. *Gautam D.K., Misro M.M., Chaki S.P. et al.* H₂O₂ at physiological concentrations modulates Leydig cell function inducing oxidative stress and apoptosis // *Apoptosis*. 2005. Vol. 12. P. 405–409.
262. *Hack C.* Interleukine-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators // *Infect. Immun.* 1992. Vol. 60. P. 2835–2842.
263. *Haddad J.J.* Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology // *Respir. Res.* 2002. Vol. 3. № 1. P. 26–30.
264. *Haddad J.J.* Pharmacoredox regulation of cytokine-related pathways: from receptor signaling to pharmacogenetics // *Free Radical Biol. Med.* 2002. Vol. 33. P. 907–926.
265. *Harada C., Nakamura K.* Role of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Stress-Induced Neural Cell Apoptosis in Vivo // *Am. J. Pathol.* 2006. Vol. 168. № 1. P. 262–269.
266. *Harris S.L., Levine A.J.* The p53 pathway: positive and negative feedback loops // *Oncogene*. 2005. Vol. 24. P. 2899–2908.
267. *Hayden M.S., Ghosh S.* Signaling to NF- κ B // *Genes Dev.* 2004. Vol. 18. P. 2195–2224.
268. *Hertog J.D., Groen A., van der Wijk T.* Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases // *Arch. Biochem. Biophys.* 2005. Vol. 434. P. 11–15.
269. *Hinds M.G., Day C.L.* Regulation of apoptosis: uncovering the binding determinants // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005. Vol. 15. P. 690–699.
270. *Ho W.C., Dickson K.M., Barker P.A.* Nuclear factor-kappa B induced by doxorubicin is deficient in phosphorylation and acetylation and represses nuclear factor-kappaB-dependent transcription in cancer cells // *Cancer Res.* 2005. Vol. 65. P. 4273–4281.
271. *Hoffmann A., Leung T.H., Baltimore D.* Genetic analysis of NF- κ B/Rel transcription factors defines functional specificities // *EMBO J.* 2003. Vol. 22. P. 5530–5539.
272. *Hook S.S., Means A.R.* Ca²⁺/CaM-dependent kinases: from activation to function // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001. Vol. 41. P. 471–505.
273. *Hsu Y.T., Youle R.J.* Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 10777–10783.
274. *Hsu Y.T., Wolter K.G., Youle R.J.* Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 94. № 8. P. 3668–3672.
275. *Huang D.C.S., Strasser A.* BH3-only proteins essential initiators of apoptotic cell death // *Cell*. 2000. Vol. 103. P. 839–842.

276. *Hydrogen* peroxide induces tumor necrosis factor alpha-mediated cardiac injury by a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism / D.R. Meldrum, C.A. Dinarello, J.C. Cleveland et al. // *Surgery*. 1998. Vol. 124. P. 291–296.
277. *Hypoxia*, angiotensin-II, and norepinephrine mediated apoptosis is stimulus specific in canine failed cardiomyocytes: a role for p38 MAPK, Fas-L and cyclin D1 / V.G. Sharov, A. Todor, G. Suzuki et al. // *Eur. J. Heart Fail*. 2003. Vol. 5. P. 121–129.
278. *Induction* of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c / X. Liu, C. Kim, J. Yang et al. // *Cell*. 1996. Vol. 86. № 1. P. 147–157.
279. *Inhibition* of C-Jun N-terminal kinase 1, but not c-Jun N-terminal kinase 2, suppresses apoptosis induced by ischemia/reoxygenation in rat cardiac myocytes / D.Hreniuk, M.Garay, W.Gaarde et al. // *Mol. Pharmacol*. 2001. Vol. 59. P. 867–874.
280. *Inhibition* of p38 MAPK a/b reduces ischemic injury and does not block protective effects of preconditioning / S. Schneider, W. Chen, J. Hou et al. // *Am J. Physiol. Heart. Circ. Physiol*. 2001. Vol. 280. P. H499–H508.
281. *Inhibition* of the cardiac p38 MAPK pathway by SB203580 delays ischemic cell death / M. Barancik, P. Htun, C. Strohm et al. // *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2000. Vol. 35. P. 474–483.
282. *Integral* role of Noxa in p53-mediated apoptotic response / T. Shibue, K. Takeda, E.Oda et al. // *Genes Dev*. 2003. Vol. 17. P. 2233–2238.
283. *Interleukin-10* (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes / R. de Waal Malefyt, J. Abrams, B. Bennett et al. // *J. Exp. Med*. 1991. Vol. 174. P. 1209.
284. *Interleukin-10* protects activated human T-lymphocytes against growth factor withdrawal-induced cell death / G. Pawelec, A. Hambrecht, A. Rehbein, M. Adibzadeh // *Cytokine*. 1996. Vol. 8. № 12. P. 877–881.
285. *Interleukin-8* induction via NF-kappa B, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase1/2 pathways in human peripheral blood mononuclear cells by *Alloiococcus otitidis* / A. Harimaya, J.I. Koizumi, N. Fujii, T. Himi // *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. 2007. Jul 12; [Epub ahead of print].
286. *Interleukin-10* rescues T-cells from apoptotic cell death: association with an up-regulation of Bcl-2 / S.B. Cohen, J.B. Crawley, M.C. Kahan et al. // *Immunology*. 1997. Vol. 92. № 1. P. 1–5.
287. *Intracellular* oxidation/reduction status in the regulation of transcription factor NF-κB and AP-1 / D. Gius, A. Botero, S. Shah, H.A. Curry // *Toxicol. Lett*. 1999. Vol. 106. P. 93–106.
288. *Involvement* of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO1 and TNF receptor-induced cell death / M. Boldin, T. Goncharov, Y.V. Goltsev, D. Wallach // *Cell*. 1996. Vol. 85. № 6. P. 803–815.
289. *Involvement* of p38 MAP kinase in lipopolysaccharide-induced production of pro- and anti-inflammatory cytokines and prostaglandin E(2) in human choroid-ecidia / T. Shoji, S. Yoshida, M. Mitsunari et al. // *J. Reprod. Immunol*. 2007. Vol. 75. № 2. P. 82–90.

290. *Ischemia/reperfusion* injury at the intersection with cell death / S.E. Logue, A.B. Gustafsson, A. Samali, R.A. Gottlieb // *J. Mol. Cell. Cardiology*. 2005. Vol. 38. P. 21–33.
291. *Ischemia/reperfusion* injury at the intersection with cell death / S.E. Logue, A.B. Gustafsson, A. Samali, R.A. Gottlieb // *J. Mol. Cell. Cardiology*. 2005. Vol. 38. P. 21–33.
292. *Jayadev S., Barrett J.C., Murphy E.* Elevated ceramide is downstream of altered calcium homeostasis in low serum-induced apoptosis // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2000. Vol. 279. № 5. P. 1640–1647.
293. *Jenkins J.K., Malyak M., Arend W.P.* The effects of interleukin-10 (IL-10) on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils // *Lymphokine Cytokine Res.* 1994. Vol. 13. P. 47–49.
294. *JNK1 physically* interacts with WW domain-containing oxidoreductase (WOX1) and inhibits WOX1-mediated apoptosis / N.S. Chang, J. Doherty, A. Ensign et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 9195–9202.
295. *JNK1-dependent* antimetabolic activity of thiazolidin compounds in human non-small-cell lung and colon cancer cells / F. Teraishi, S. Wu, J. Sasaki, L. Zhang // *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005. Vol. 62. P. 2382–2389.
296. *JNK2* is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development / K. Sabapathy, Y. Hu, T. Kallunki et al. // *Curr. Biol.* 1999. Vol. 9. P. 116–125.
297. *Johnson G.L., Lapadat R.* Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinase // *Science*. 1998. Vol. 298. P. 1911–1912.
298. *Joza N., Susin S.A., Daugas E.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death // *Nature*. 2001. Vol. 410. P. 549–554.
299. *Joza N., Susin S.A., Daugas E. et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death // *Nature*. 2001. Vol. 410. № 6828. P. 549–554.
300. *JSAP1*, a novel Jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a scaffold factor in the JNK signaling pathway / M. Ito, K. Yoshioka, M. Akechi et al. // *Mol. Cell. Biol.* 1999. Vol. 19. P. 7539–7548.
301. *Kim M.S., Lim W.K., Park R.K. et al.* Involvement of mitogen-activated protein kinase and NF- κ B activation in Ca²⁺-induced IL-8 production in human mast cells // *Cytokine*. 2005. Vol. 32. № 5. P. 226–233.
302. *Kim S.J., Hwang S.G., Shin D.Y. et al.* p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NF- κ B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 33501–33508.
303. *Kinyamu H.K., Archer T.K.* Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in mdm2 protein expression // *Mol. Cell. Biol.* 2003. Vol. 23. P. 5867–5881.
304. *Klein J.A., Ackerman S.L.* Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration // *J. Clin. Invest.* 2003. Vol. 111. № 6. P. 785–793.

305. *Kofler R.* The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells // *Histochem. Cell Biol.* 2000. Vol. 114. P. 1–7.
306. *Krieger-Brauer H.I., Kather H.* The stimulus-sensitive H₂O₂-generating system present in human fat-cell plasma membranes is multireceptor-linked and under antagonistic control by hormones and cytokines // *Biochem. J.* 1995. Vol. 307. № 2. P. 543–548.
307. *Kroemer G., Zamzani N., Susin S.A.* Mitochondrial control of apoptosis // *Immunol. Today.* 1997. Vol. 18. № 1. P. 44–51.
308. *Kroemer G., Reed J.C.* Mitochondrial control of cell death // *Nat. Med.* 2000. Vol. 6. P. 513–519.
309. *Lakshminarayanan V., Drab-Weiss E.A., Roebuck K.A.* H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappa B to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. № 49. P. 32670–32678.
310. *Lavrik I.N., Golks A.* Caspases: pharmacological manipulation of cell death // *J. Clin. Invest.* 2005. Vol. 115. № 10. P. 653–655.
311. *Lei K., Davis R.J.* JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. Vol. 100. P. 2432–2439.
312. *Levine A.J., Hu W., Feng Z.* The P53 pathway: what questions remain to be explored? // *Cell Death and Diff.* 2006. Vol. 48. P. 456–462.
313. *Li L.F., Ouyang B., Choukroun G. et al.* Stretch-induced IL-8 depends on c-Jun NH2-terminal and nuclear factor-kappa B-inducing kinases // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2003. Vol. 285. № 2. P. 464–475.
314. *Li L.Y., Luo X., Wang X.* Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria // *Nature.* 2001. Vol. 412. P. 95–99.
315. *Lim W., Ma W., Gee K. et al.* Distinct role of p38 and c-Jun N-terminal kinases in IL-10-dependent and IL-10-independent regulation of the costimulatory molecule B7.2 in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells // *J. Immunol.* 2002. Vol. 168. № 4. P. 1759–1769.
316. *Lin M.T., Beal M.F.* Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases // *Nature.* 2006. Vol. 443. № 19. P. 787–795.
317. *Liochev S.I., Fridovich I.* The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation // *Free Radical Biol. Med.* 2007. Vol. 42. P. 1465–1469.
318. *Little S.A., de Haën C.* Effects of hydrogen peroxide on basal and hormone-stimulated lipolysis in perfused rat fat cells in relation to the mechanism of action of insulin // *J. Biol. Chem.* 1980. Vol. 255. № 22. P. 10888–10895.
319. *Lo Y.Y., Cruz T.F.* Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. № 20. P. 11727–11730.
320. *Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B-cells / A. Enders, P. Bouillet, H. Puthalakath et al. // J. Exp. Med.* 2003. Vol. 198. P. 1119–1126.
321. *Lotem J., Kama R., Sachs L.* Suppression or induction of apoptosis by opposing pathways downstream from calcium-activated calcineurin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. Vol. 96. P. 12016–1220.

322. *Lowe S.W., Lin A.W.* Apoptosis in cancer // *Carcinogenesis*. 2000. Vol. 21. P. 485–495.
323. *Lynch D.H., Ramsdell F., Alderson M.R.* Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses // *Immunol Today*. 1995. № 12. P. 569–574.
324. *Maintenance* of the T-lymphocyte pool by inhibition of apoptosis: a novel strategy of immunostimulation? / G. Kroemer, N. Zamzami, P. Marchetti et al. // *Microbiol. Immunol.* 1995. Vol. 200. P. 223–235.
325. *MAP-1* is a mitochondrial effector of Bax / K.O. Tan, N.Y. Fu, S.K. Sukumaran et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. Vol. 10. P. 14623–14628.
326. *MAPK* superfamily plays an important role in daunomycin-induced apoptosis of cardiac myocytes / W. Zhu, Y. Zou, R. Aikawa et al. // *Circulation*. 1999. Vol. 100. P. 2100–2107.
327. *May J.M., de Haën C.* The insulin-like effect of hydrogen peroxide on pathways of lipid synthesis in rat adipocytes // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254. № 18. P. 9017–9021.
328. *Mcl-1* deficiency results in peri-implantation embryonic lethality / J.L. Rinckenberger, S. Horning, B. Klocke et al. // *Genes Dev.* 2000. Vol. 14. P. 23–27.
329. *Mayr M., Hu Y., Hainaut H., Xu Q.* Mechanical stress-induced DNA damage and rac-p38MAPK signal pathways mediate p53-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells // *FASEB J.* 2002. Vol. 16. P. 1423–1425.
330. *Mikhailov V., Mikhailova M., Degenhardt K. et al.* Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release // *J. Biol Chem.* 2003. Vol. 278. № 7. P. 5367–5376.
331. *Mikkelsen R.B., Wardman P.* Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms // *Oncogene*. 2003. Vol. 22. P. 5734–5754.
332. *Mitochondrial* dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death / J.J. Lemasters, T. Qian, C.A. Bradham et al. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1999. Vol. 31. № 4. P. 305–319.
333. *Mitochondrial* intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death / M. Crompton, E. Barksby, N. Johnson, M. Capano // *Biochimie*. 2002. Vol. 84. P. 143–152.
334. *Mitochondrial* involvement in nitric oxide-induced cellular death in cortical neurons in culture / S. Figueroa, M.J. Oset-Gasque, C. Arce, C.J. Martinez-Honduvilla // *J. Neurosci Res.* 2006. Vol. 5. P. 100–104.
335. *Mitochondrial* permeability transition triggers lymphocyte apoptosis / P. Marchetti, T. Hirsch, N. Zamzami et al. // *J. Immunol.* 1996. № 11. P. 4830–4836.
336. *Mitogen-activated* protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human / C. Widmann, S. Gibson, M.B. Jarpe, G.L. Johnson // *Physiol. Rev.* 1999. Vol. 79. P. 143–80.
337. *MKK6* activates myocardial cell NF- κ B and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner / D. Zechner, R. Craig, D.S. Hanford et al. // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 8232–8239.
338. *Modulation* of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology / K.K. Griendling, D. Sorescu, B. Lassugue, M. Ushio-Fukai // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000. Vol. 20. № 10. P. 2175–2183.

339. *Moll U.M.* p53, p63 and p73-solos, alliances and feuds among family members // *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. Vol. 1552. P. 47–59.
340. *Moulton P.J., Goldring M.B., Hancock J.T.* NADPH oxidase of chondrocytes contains an isoform of the gp91phox subunit // *Biochem J.* 1998. Vol. 329. № 3. P. 449–541.
341. *Mukhopadhyay A., Manna S.K., Aggarwal B.B.* Pervanadate-induced nuclear factor- κ B activation requires tyrosine phosphorylation and degradation of I κ B. Comparison with tumor necrosis factor- α // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 8549–8555.
342. *Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax / T.W. Sedlak, Z.N. Oltvai, E. Yang et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 7834–7838.
343. *Murrell G., Bromley F.N.* Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals // *Biochem. J.* 1990. Vol. 265. P. 659–665.
344. *Miki S., Ashraf M., Salka S., Sperelakis N.* Myocardial dysfunction and ultra-structural alterations mediated by oxygen metabolites // *J. Mol Cell Cardiol.* 1988. Vol. 20. P. 1009–1024.
345. *Nagata S.* Apoptosis by death factor // *Cell.* 1997. Vol. 88. P. 355–365.
346. *Nakano K., Vousden K.H.* PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53 // *Mol. Cell.* 2001. Vol. 7. P. 683–694.
347. *Nerve growth factor inhibits apoptosis in memory B-lymphocytes via inactivation of p38 MAPK, prevention of Bcl-2 phosphorylation, and cytochrome c release / M. Torcia, G. De Chiara, L. Nencioni et al.* // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 39027–39036.
348. *Newmeyer D.D., Ferguson-Miller S.* Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death // *Cell.* 2003. Vol. 112. P. 481–490.
349. *NF- κ B and I α B are found in the mitochondria. Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF- κ B / P.C. Cogswell, D.F. Kashatus, J.A. Keifer et al.* // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 2963–2968.
350. *NF- κ B and JNK: an intricate affair / C. Bubici, S. Papa, C.G. Pham* // *Cell Cycle.* 2004. Vol. 3. P. 1524–1529.
351. *NF- κ B blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia / M. Dajee, M. Lazarov, J.Y. Zhang et al.* // *Nature.* 2003. Vol. 421. P. 639–643.
352. *Nicholson D.W.* Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death // *Cell Death Differ.* 1999. Vol. 6. P. 1028–1042.
353. *Oda E., Ohki R., Murasawa H. et al.* Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis // *Science.* 2000. Vol. 288. P. 1053–1058.
354. *Opferman J., Iwasaki H., Ong C.C. et al.* Obligate role of anti-apoptotic Mcl-1 in the survival of hematopoietic stem cells // *Science.* 2005. Vol. 307. P. 1101–1104.
355. *Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel / L.M. Dejean, S. Martinez-Caballero, L. Guo et al.* // *Mol. Biol. Cell.* 2005. Vol. 16. P. 2424–2432.
356. *Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence / G. Ferbeyre, E. de Stanchina, A.W. Lin et al.* // *Mol. Cell. Biol.* 2002. Vol. 10. P. 3497–3508.

357. *Opposing* effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis / Z. Xia, M. Dickens, J. Raingeaud et al. // *Science*. 1995. Vol. 270. P. 1326–1331.
358. *Oren M.* Decision making by p53: life, death and cancer // *Cell Death Differ.* 2003. Vol. 10. P. 431–442.
359. *Oscillations* in NF- κ B signaling control the dynamics of gene expression / D.E. Nelson, A.E. Ihekweba, M. Elliott // *Science*. 2004. Vol. 306. P. 704–708.
360. *Keulenaer G.W., Chappell D.C., Ishizaka N. et al.* Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase // *Circ Res.* 1998. Vol. 82. № 10. P. 1094–1101.
361. *Oudin S., Pugin J.* Role of MAP kinase activation in interleukin-8 production by human BEAS-2B bronchial epithelial cells submitted to cyclic stretch // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002. Vol. 27. P. 107–114.
362. *Oxidant-Mediated Mitochondrial Injury in Eosinophil Apoptosis: Enhancement by Glucocorticoids and Inhibition by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* / L.A. Smets, S.J. Gardai, R. Hoontrakoon et al. // *J. Immun.* 1999. Vol. 58. P. 556–566.
363. *Oxidants* as stimulators of signal transduction / Y.I. Suzuki, H.S. Firman, A. Sevanian et al. // *Free Radic. Biol. Med.* 1997. Vol. 22. P. 269–285.
364. *Oxygen* stress: a regulator of apoptosis in yeast / F. Madeo, E. Fröhlich, M. Ligr et al. // *J. Cell Biol.* 1999. № 4. P. 757–767.
365. *p38 and* extracellular signal-regulated kinase mitogen-protein kinase pathways are required for nuclear factor B p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor / W. Vanden Berghe, S. Plaisance, E. Boone // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 3285–3290.
366. *p38 MAPK* and NF- κ B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. Evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system / R. Craig, A. Larkin, A.M. Mingo et al. // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 23814–23824.
367. *p38 Mitogen-activated* protein kinase regulates IL-8 expression in human pulmonary vascular endothelial cells / S. Hashimoto, K. Matsumoto, Y. Gon et al. // *Eur. Respir. J.* 1999. Vol. 13. P. 1357–1364.
368. *p53- and* drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins Puma and Noxa / A. Villunger, E.M. Michalak, L. Coultas et al. // *Science*. 2003. Vol. 302. P. 1036–1038.
369. *p53 has* a direct apoptogenic role at the mitochondria / M. Mihara, S. Erster, A. Zaika et al. // *Mol. Cell.* 2003. Vol. 11. P. 552–554.
370. *p53 induces* NF- κ B activation by an I κ B kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1 / J. Bohuslav, L.F. Chen, H. Kwon et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 26115–26125.
371. *p53 tumor* suppressor protein regulates the levels of huntingtin gene expression / Z. Feng, S. Jin, A. Zupnick et al. // *Oncogene*. 2005. Vol. 24. P. 1–7.
372. *p63 is* a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis / A.A. Mills, B. Zheng, X.J. Wang et al. // *Nature*. 1999. Vol. 398. P. 708–713.
373. *Pahl H.L.* Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors // *Oncogene*. 1999. Vol. 18. P. 6853–6866.

-
374. *Peers C., Kemp P.J.* Acute oxygen sensing: Diverse but convergent mechanisms in airway and arterial chemoreceptors // *Respir. Res.* 2001. Vol. 2. P. 145–149.
375. *Perkins N.D.* Achieving transcriptional specificity with NF- κ B // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997. Vol. 29. P. 1433–1448.
376. *Perkins N.D.* NF- κ B: tumor promoter or suppressor? // *Trends Cell Biol.* 2004. Vol. 14. P. 64–69.
377. *Perkins N.D., Gilmore T.D.* Good cop, bad cop: the different faces of NF- κ B // *Cell Death Differ.* 2006. Vol. 13. № 5. P. 759–772.
378. *Peter M.E., Krammer P.H.* The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond // *Cell Death Differ.* 2003. Vol. 10. P. 26–35.
379. *Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation* / P. Viatour, M.P. Merville, V. Bours et al. // *Trends Biochem. Sci.* 2005. Vol. 30. P. 43–52.
380. *Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation* / T. Lawrence, D.W. Gilroy, P.R. Colville-Nash et al. // *Nat. Med.* 2001. Vol. 7. P. 1291–1297.
381. *Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage* / K. Webley, A. Jane, I. Bond et al. // *Molecular and Cellular Biology.* 2000. Vol. 20. P. 2803–2808.
382. *Price M.A., Rogers A.E., Treisman R.* Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET) // *EMBO J.* 1995. Vol. 14. P. 2589–2601.
383. *Prives C., Hall P.A.* The p53 pathway // *J. Path.* 1999. Vol. 187. P. 112–126.
384. *Pro-apoptotic* Bak is sequestered by Mc1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins / S.N. Willis, L. Chen, G. Dewson et al. // *Genes Dev.* 2005. Vol. 19. P. 1294–1305.
385. *Pro-apoptotic* Bax and Bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death / M.C. Wei, W.X. Zong, E.H. Cheng et al. // *Science.* 2001. Vol. 292. P. 727–730.
386. *Pro-apoptotic* Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity / P. Bouillet, D. Metcalf, D.C.S. Huang et al. // *Science.* 1999. Vol. 286. P. 1735–1738.
387. *Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D* / E. Basso, L. Fante, J. Fowlkes et al. // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 18558–18561.
388. *Protein kinase CK2 promotes aberrant activation of nuclear factor- κ B, transformed phenotype, and survival of breast cancer cells* / R. Romieu-Mourez, E. Landesman-Bollag, D.C. Seldin et al. // *Cancer Res.* 2002. Vol. 62. P. 6770–6778.
389. *Protein kinase C ϵ interacts with Bax and promotes survival of human prostate cancer cells* / M.A. McJilton, C. Van Sikes, G.G. Wescott et al. // *Oncogene.* 2003. Vol. 22. P. 7958–79568.
390. *Protein kinase C- ϵ promotes survival of lung cancer cells by suppressing apoptosis through dysregulation of the mitochondrial caspase pathway* / L. Ding, H. Wang, W. Lang, L. Xiao // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 35305–35313.

391. *Puma* induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells / J. Yu, L. Zhang, P.M. Hwang et al. // *Mol. Cell*. 2001. Vol. 7. P. 673–682.
392. *Puma* is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways / J.R. Jeffers, E. Parganas, Y. Lee et al. // *Cancer Cell*. 2003. Vol. 4. P. 321–328.
393. *Ranger A.M., Malynn B.A., Korsmeyer S.J.* Mouse models of cell death // *Nat. Gen.* 2001. Vol. 28. P. 113–118.
394. *Rationale* for Bcl-x_L/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies / A.M. Petros, D.G. Nettseheim, Y. Wang et al. // *Protein Sci.* 2000. Vol. 9. P. 2528–2534.
395. *Reactive* oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases / H. Kamata, S. Honda, S. Maeda et al. // *Cell*. 2005. Vol. 120. P. 649–661.
396. *Reciprocal* inhibition of p53 and nuclear factor-kappa B transcriptional activities determines cell survival or death in neurons / C. Culmsee, J. Siewe, V. Junker et al. // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23. P. 8586–8595.
397. *Redox* regulation of interleukin-8 expression in MKN28 cells / T. Shimada, N. Watanabe, H. Hiraishi, A. Terano // *Dig. Dis. Sci.* 1999. Vol. 44. № 2. P. 266–273.
398. *Regula K.M., Ens K., Kirshenbaum L.A.* Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2003. Vol. 35. P. 559–567.
399. *Regulation* of human airway epithelial cell IL-8 expression by MAP kinases / J. Li, S. Kartha, S. Iasovskaia, A. Tan et al. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2002. Vol. 283 P. L690–L699.
400. *Regulation* of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases / A.D. Foey, S.L. Parry, L.M. Williams et al. // *J. Immunol.* 1998. Vol. 160. № 2. P. 920–928.
401. *Regulation* of NF- κ B and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor / S.Rocha, M.D. Garrett, K.J. Campbell et al. // *EMBO J.* 2005. Vol. 24. P. 1157–1169.
402. *Regulation* of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation / C. Koumenis, R. Alarcon, E. Hammond, P. Sutphin et al. // *Mol. Cell Biol.* 2001. Vol. 21. P. 1297–1310.
403. *Regulation* of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1 / G. Asher, J. Lotem, B. Cohen et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98. P. 1188–1193.
404. *Relationship* between interleukin-8 and the oxidant-antioxidant system in end-stage renal failure patients / M. Aydin, E. Ozkok, O. Ozturk et al. // *Exp. Clin. Transplant.* 2007. Vol. 5. № 1. P. 610–613.
405. *Requirement* of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway / C. Tournier, P. Hess, D.D. Yang et al. // *Science.* 2000. Vol. 288. P. 870–874.
406. *Rhabdomyosarcoma* cell lines are resistant to Fas- and highly sensitive to TRAIL-induced apoptosis / I. Petak, D.M. Tillman, F.G. Harwood et al. // *Clin. Cancer Res.* 2000. Vol. 6. P. 4432–4441.

-
407. Rincon M., Pedraza-Alva G. JNK and p38 MAP kinases in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells // Immunol. Rev. 2003. Vol. 192. P. 131–142.
408. Rincon V., Flavell R.A., Davis R.A. The JNK and p38 MAP kinase signaling pathways in cell-mediated immune responses // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 28. P. 1328–1337.
409. Rocha S., Campbell K.J., Perkins N.D. p53- and Mdm2-independent repression of NF- κ B transactivation by the ARF tumor suppressor // Mol. Cell. 2003. Vol. 12. P. 15–25.
410. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line / J.S. Armstrong, K.K. Steiner, B. Hornung et al. // Cell Death Differ. 2002. Vol. 9. P. 252–263.
411. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling / V. Adler, Z. Yin, K.D. Tew, Z. Ronai // Oncogene. 1999. Vol. 18. P. 6104–6111.
412. Role of the stress-activated protein kinases in endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy / G. Choukroun, R. Hajjar, J.M. Kyriakis et al. // J. Clin. Investig. 1998. Vol. 102. P. 1311–1320.
413. Roles of nuclear factor κ B in neuronal survival and plasticity / M.P. Mattson, C. Culmsee, Z. Yu, S. Camandola // Int. Soc. for Neurochem. 2000. Vol. 5. P. 238–247.
414. Saccani S., Pantano S., Natoli G. Modulation of NF- κ B activity by exchange of dimmers // Mol. Cell. 2003. № 11. P. 1563–1574.
415. Saccani S., Pantano S., Natoli G. p38-dependent marking of inflammatory genes for increased NF- κ B recruitment // Nat. Immunol. 2002. № 3. P. 69–75.
416. Sawatzky D.A., Willoughby D.A. The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-xL and Bax in the resolution of acute inflammation *in vivo* // Am. J. Path. 2006. Vol. 168. № 1. P. 33–41.
417. Schuler S., Green D. Mechanisms of p53-dependent apoptosis // Biochem. Soc. Trans. 2001. Vol. 29. P. 684–688.
418. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors / S. Gupta, T. Barrett, A.J. Whitmarsh et al. // EMBO J. 1996. Vol. 15. P. 2760–2770.
419. Seoane J., Le H.V., Massagué J. Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage // Nature. 2002. Vol. 419. P. 729–734.
420. Shapiro L., Dinarello C.A. Osmotic regulation of cytokine synthesis *in vitro* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. P. 12230–12234.
421. Shaulian E., Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death // Nat. Cell Biol. 2002. Vol. 4. P. E131–E136.
422. Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC // Nature. 1999. Vol. 399. P. 483–487.
423. Shut down of an acute T-cell immune response to viral infection is mediated by the pro-apoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim / M. Pellegrini, G. Belz, P. Bouillet et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. P. 14175–14180.

424. *Smac*, a Mitochondrial Protein that promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition / C.Du, M.Fang, Y.Li et al. // *Cell*. 2000. Vol. 102. P. 33–42.
425. *Soance L., Solonski N., Fiskum G.* Mitochondrial mechanisms of oxidative stress and apoptosis. *Handbook of neurochemistry*, 2006. P. 20.
426. *Solution* structure of the anti-apoptotic protein Bcl-2 / A.M. Petros, A. Medek, D.G. Nettlesheim et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. Vol. 98. P. 3012–3017.
427. *Squamous* cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor- κ B signaling / M. van Hogerlinden, B.L. Rozell, L. Ahrlund-Richter // *Cancer Res*. 1999. Vol. 59. P. 3299–3303.
428. *Stark L.A., Dunlop M.G.* Nucleolar sequestration of RelA (p65) regulates NF- κ B-driven transcription and apoptosis // *Mol. Cell. Biol*. 2005. Vol. 25. P. 5985–6004.
429. *Steinman H.M.* The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant // *J. Biol. Chem*. 1995. Vol. 270. P. 3487–3490.
430. *Strasser A., O'Connor L., Dixit V.M.* Apoptosis signaling // *Annu. Rev. Biochem*. 2000. Vol. 69. P. 217–245.
431. *Structural* basis of IAP recognition by Smac/DIABLO / G. Wu, J. Chai, T.L. Suber et al. // *Nature*. 2000. Vol. 408. P. 1008–1012.
432. *Sattler M., Liang H., Nettlesheim D. et al.* Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis // *Science*. 1997. Vol. 275. P. 983–986.
433. *Sun Y., Oberley J.W.* Redox regulation of transcriptional activator // *Free Radic. Biol. Med*. 1996. Vol. 21. P. 335–348.
434. *Suppression* by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases / Y.J. Kang, Z.X. Zhou, G.W. Wang et al. // *J. Biol. Chem*. 2000. Vol. 275. P. 13690–13698.
435. *Suppression* of stress kinase JNK is involved in HSP72-mediated protection of myogenic cells from transient energy deprivation. HSP72 alleviates the stress-induced inhibition of JNK dephosphorylation / V.L. Gabai, A.B. Meriin, J.A. Yaglom et al. // *J. Biol. Chem*. 2000. Vol. 275. P. 38088–38094.
436. *Susin S.A., Zamzami N., Kroemer G.* Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more // *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. Vol. 1366. P. 151–165.
437. *Suzuki M., Youle R.J., Tjandra N.* Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization // *Cell*. 2000. Vol. 103. P. 645–654.
438. *Teraishi F., Wu S.* Identification of a novel synthetic thiazolidin compound capable of inducing c-Jun NH2-terminal kinase-dependent apoptosis in human colon cancer cells // *Cancer Res*. 2005. Vol. 65. № 14. P. 6380–6387.
439. *Testicular* degeneration in Bcl-w-deficient mice / A.J. Ross, K.G. Waymire, J.E. Moss et al. // *Nat. Gen*. 1998. Vol. 18. P. 251–256.
440. *The ASK1-MAP* kinase cascades in mammalian stress response / J. Matskawa, A. Matsuzawa, K. Takeda, H. Ichijo // *J. Biochem*. 2004. Vol. 136. № 3. P. 261–265.
441. *The combined* functions of pro-apoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues / T. Lindsten, A.J. Ross, A. King et al. // *Mol. Cell*. 2000. Vol. 6. P. 1389–1399.

442. *The model* for p53-induced apoptosis / K. Polyak, Y. Xia, J.L. Zweier et al. // Nature. 1997. Vol. 389. P. 300–305.
443. *The p53* MH algorithm and its application in detecting p53-responsive gene / J. Hoh, S. Jin, T. Parrado et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99. P. 8467–8472.
444. *The structure* of a Bcl-x_L/Bim fragment complex: Implications for Bim function / X. Liu, S. Dai, Y. Zhu et al. // Immunity. 2003 Vol. 19. P. 341–352.
445. *The ubiquitin* ligase COP1 is a critical negative regulator of p53 / D. Dornan, I. Wertz, H. Shimizu et al. // Nature. 2004. Vol. 429. P. 86–92.
446. *Thornberry N.A., Lazebnik Y.* Caspases: enemies within // Science. 1998. Vol. 281. P. 1312–1316.
447. *Tissue oxygen* sensor function of NADPH oxidase isoforms, an unusual cytochrome aa3 and reactive oxygen species / T. Porwol, W. Ehleben, V. Brand, H. Acker // Respir. Physiol. 2001. Vol. 128. P. 331–348.
448. *To be, or not to be:* NF-κB is the answer role of Rel/NF-κB in the regulation of apoptosis / J. Kucharczak, M.J. Simmons, Y.J. Fan et al. // Oncogene. 2003. Vol. 22. P. 8961–8982.
449. *Transcriptional* regulation by calcium, calcineurin, and NFAT / P.G.Hogan, L.Chen, J.Nardone, A.Rao // Genes Dev. 2003. Vol. 17. P. 2205–2232.
450. *Transcriptional* regulation of lysophosphatidic acid-induced interleukin-8 expression and secretion by p38 MAPK and JNK in human bronchial epithelial cells / B. Saatian, Y. Zhao, D. He et al. // Biochem J. 2006. Vol. 393. P. 657–668.
451. *Transcriptional* repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53 / W.H. Hoffman, S. Biade, J.T. Zilfou et al. // Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 3247–3257.
452. *Transcription-independent* pro-apoptotic functions of p53 / U.M. Moll, S. Wolff, D. Speidel, W. Deppert // Curr. Opin. Cell Biol. 2005. Vol. 17. P. 631–636.
453. *Tsujimoto Y.* Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? // Genes to Cells 1998. Vol. 3. P. 697–707.
454. *Tumor* necrosis factor receptor 1-mediated signaling is required for skin cancer development induced by NF-κB inhibition / M.H. Lind, B. Rozell, R.P. Wallin et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101. P. 4972–4977.
455. *Two* inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes / D.A. Joyce, D.P. Gibbons, P. Green et al. // Eur. J. Immunol. 1994. Vol. 24. P. 2699–2670.
456. *Tyrosine* phosphorylation of IκB-α activates NF-κB without proteolytic degradation of IκB-α / V. Imbert, R.A. Rupec, A. Livolsi et al. // Cell. 1996. Vol. 86. P. 787–798.
457. *Up-regulation* of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-α and cAMP elevating drugs / C. Platzer, C. Meisel, K. Vogt et al. // Int. Immunol. 1995. Vol. 7. P. 517–519.
458. *UV-induced* expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p38 activated upstream stimulation factor-1 (USF-1) / S. Corre, A. Primot, E. Sviderskaya et al. // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. P. 51226–51233.

459. *VDAC2* inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis / E.H. Cheng, T.V. Sheiko, J.K. Fisher et al. // *Science*. 2003. Vol. 301. P. 513–517.
460. *Vlessis A.A., Goldman R.K., Trunkey D.D.* New concepts in the pathophysiology of oxygen metabolism during sepsis // *Br. J. Surg.* 1995. Vol. 82. № 7. P. 870–876.
461. *Wang S., El-Deiry W.S.* TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors // *Oncogene*. 2003. Vol. 22. P. 8628–8633.
462. *Wenger R.H.* Mammalian oxygen sensing, signaling and gene regulation // *J. Exp. Biol.* 2000. Vol. 203. № 8. P. 1253–1263.
463. *Xia L., Paik A., Li J.J.* p53 Activation in Chronic Radiation-Treated Breast Cancer Cells: Regulation of MDM2/p14ARF // *Cancer Res.* 2004. Vol. 64. P. 221–228.
464. *Yamamoto K.R., Ichijo H., Korsmeyer S.J.* Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M // *Mol. Cell Biol.* 1999. Vol. 19. P. 8469–8478.
465. *Yamamoto K.R.* Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks // *Annu. Rev. Genet.* 1985. Vol. 19. P. 209–252.
466. *Yeh W.-C., Pompa J.L., McCurrach M.E.* FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all // *Science*. 1998. Vol. 279. № 358. P. 1954–1958.
467. *Zhou J., Prives C.* Replication of damaged DNA *in vitro* is blocked by p53 // *Nucleic Acids Research*. 2003. Vol. 31. P. 3881–3892.
468. *Zhou X., Yang N., Lu L. et al.* Up-regulation of IL-10 expression in dendritic cells is involved in Trichosanthin-induced immunosuppression // *Immunol. Lett.* 2007. Vol. 110. № 1. P. 74–81.
469. *Zhu H., Bunn H.F.* Signal transduction. How do cells sense oxygen? // *Science*. 2001. Vol. 292. P. 449–451.
470. *Zoccarato F., Cavallini L., Alexandre A.* Mitochondria free radicals formation // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 4166–4174.
471. *Hoover H.E., Thuerauf D.J., Martindale J.J., Glembotski C.C.* α B-crystallin gene induction and phosphorylation by MKK6-activated p38. A potential role for a B-crystallin as a target of the p38 branch of the cardiac stress response // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 23825–23833.

Список сокращений и обозначений

| | |
|---------|--|
| АДФ | – аденозиндифосфат |
| АОС | – антиоксидантная система |
| АТФ | – аденозинтрифосфат |
| АФК | – активные формы кислорода |
| ГМ-КСФ | – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор |
| ДХФ-ДА | – дихлорфлуоресцеина диацетат |
| ЛПС | – липолисахарид |
| МАРК | – Mitogen-activated protein kinase (митогенактивируемые протеинкиназы) |
| МАРККК | – МАРК Kinase Kinase |
| мРНК | – матричная рибонуклеиновая кислота |
| НАДФ-Н | – никотинамидадениндинуклеотидфосфат-Н |
| п.о. | – пара оснований |
| ПОЛ | – перекисное окисление липидов |
| ПЦР | – полимеразная цепная реакция |
| РТ-пора | – пора пермеабиллизационного перехода |
| СОД | – супероксиддисмутаза |
| УФ | – ультрафиолетовый |
| ФСБ | – фосфатно-солевой буфер |
| цАМФ | – циклический аденозинмонофосфат |
| AIF | – apoptosis inducing factor (апоптозиндуцирующий фактор) |
| ANT | – транслокатор адениловых нуклеотидов |
| ASK1 | – apoptosis signal-regulating kinase 1 |
| ВН | – Bcl-2 гомологический домен |
| ЕРК | – extracellular signal-regulated kinase |
| FITC | – флюоресцинизоцианат |

| | |
|--------------|---|
| IκB | – Inhibitor kappa B (ингибитор каппа В) |
| IL | – Interleukin (интерлейкин) |
| INF γ | – Interferon (интерферон) γ |
| JNK | – c-Jun N-terminal kinase |
| MAP | – Mitogen-activated protein (митогенактивируемый протеин) |
| NF-κB | – nuclear factor kappa B |
| NIK | – NF-κB-индуцирующая киназа |
| NK | – натуральный киллер |
| NMDA | – N-метил-D-аспаратат |
| PK | – протеинкиназы |
| SAPK | – Stress activated protein kinase |
| TNF | – Tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли) |
| TRADD | – TNF-ассоциированный домен смерти |
| VDAC | – порин-вольтаж зависимый канал |
| $\Delta\psi$ | – митохондриальный трансмембранный потенциал |

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----|
| Введение | 3 |
| Глава 1. Молекулярные основы взаимосвязи апоптоза и окислительного стресса | 5 |
| 1.1. Окислительная регуляция и дисрегуляция клеток | 5 |
| 1.2. Молекулярные механизмы регуляции апоптоза | 13 |
| 1.3. Редокс-чувствительные механизмы регуляции апоптоза | 23 |
| Глава 2. Особенности реализации апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови в условиях окислительного стресса | 30 |
| 2.1. Моделирование окислительного стресса мононуклеарных лейкоцитов крови <i>in vitro</i> | 31 |
| 2.2. Закономерности реализации летальной программы мононуклеарных лейкоцитов при окислительном стрессе | 35 |
| Глава 3. Роль MAP-киназ в регуляции апоптоза при окислительном стрессе | 54 |
| Глава 4. Участие редокс-чувствительных транскрипционных факторов в реализации программы апоптоза при окислительном стрессе | 80 |
| 4.1. Про- и антиапоптогенная функция p53. Роль p53 в регуляции апоптоза при окислительном стрессе | 81 |
| 4.2. Функции ядерного фактора NF-κB и запрограммированная клеточная смерть | 88 |
| Глава 5. Состояние системы белков-регуляторов апоптоза при окислительном стрессе | 95 |
| Заключение | 109 |
| Литература | 117 |
| Список сокращений и обозначений | 145 |

Научное издание

**Часовских Наталия Юрьевна
Рязанцева Наталья Владимировна
Новицкий Вячеслав Викторович**

**АПОПТОЗ
И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС**

Редактор **А.В. Базавлук**
Корректор **Е.В. Литвинова**
Технический редактор **О.А. Турчинович**
Оригинал-макет издательства **«Печатная мануфактура»**

Лицензия ИД № 03931 от 07.02.2001.
Подписано в печать 30.01.2009.
Формат 60×84¹/₁₆. Печать офсетная. Бумага ВХИ.
Гарнитура «Кудряшов». Печ. л. 9,25. Усл. печ. л. 8,61. Уч.-изд. л. 9,64.
Тираж 500 экз. Заказ № 940.

ООО «Печатная мануфактура».
634055, г. Томск, а/я 3967.
Тел./факс: (3822) 493-119.
E-mail: pechat@tomsk.ru