



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: не действует (последнее изменение статуса: 23.09.2021)
Пошлина: учтена за 6 год с 23.03.2017 по 22.03.2018. Возможность восстановления: нет.

(21)(22) Заявка: [2012111026/15](#), 22.03.2012(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.03.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.03.2012

(45) Опубликовано: [27.07.2013](#) Бюл. № 21(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2379056 C2, 20.01.2010. RU 2426548
C2, 20.08.2011. KZ 23473 A4, 15.12.2010. CN
101642570 A, 10.02.2010.

Адрес для переписки:

634050, г.Томск, Московский тракт, 2, ГБОУ
ВПО СибГМУ, отдел ИС и В, Н.Г. Зубаревой

(72) Автор(ы):

Старикова Елена Григорьевна (RU),
Таширева Любовь Александровна (RU),
Рязанцева Наталья Владимировна (RU),
Новицкий Вячеслав Викторович (RU),
Васильева Ольга Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального
образования "Сибирский государственный
медицинский университет" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России)
(RU)

(54) СРЕДСТВО И СПОСОБ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области медицины и предназначена для индукции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat. Заявлено применение донора монооксида углерода - CORM-2 для индукции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat. Способ включает культивирование опухолевых клеток линии Jurkat в полной питательной среде. Затем вводят CORM-2 в конечной концентрации 50 мкМ с последующей экспозицией в течение 24 ч в условиях 5% CO₂ и при температуре 37°C. Заявленная группа изобретений позволяет эффективно индуцировать апоптоз клеток и может быть использована для лечения онкозаболеваний. 1 ил., 3 табл., 1 пр., 2 н.п. ф-лы.

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

Группа изобретений относится к области медицины, онкологии и может быть использована для индукции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.

Заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований является одной из наиболее актуальных проблем в современной медицине. В патогенезе опухолевого роста выделяют 3 стадии: стадию трансформации нормальной клетки в опухолевую (стадия инициации); стадию размножения опухолевых клеток (стадия промоции); стадию опухолевой прогрессии. Изучение механизмов опухолевого перерождения привело исследователей к выводу о том, что канцерогенез зависит не только от пролиферативной активности опухолевого клона, но и от его возможностей избежать регулирующую клеточную гибель (Антонеева И.И. Петров С.Б. Маркеры апоптоза и пролиферации опухолевых клеток по мере прогрессирования рака яичников // Онкология. - 2008. - Т.10. №2. - С.234-237). В результате генетических мутаций

снижается способность трансформированных клеток активировать программу апоптоза, что, с одной стороны, способствует прогрессированию опухолевого процесса, а с другой - может стать причиной множественной лекарственной устойчивости (Абраменко И.В., Фильченков А.А., Оценка параметров апоптоза в диагностике онкологических заболеваний, их прогнозе и оптимизации схем терапии // Вопросы онкологии. - 2003. - Т.49. - С.21-30).

В настоящее время предложено множество средств, направленных на активацию апоптоза опухолевых клеток. Для стимулирования апоптоза предлагается обрабатывать опухолевые клетки водно-спиртовым экстрактом болиголова (Патент РФ № 2340349, А61К 36/18, А61К 47/10, А61Р 35/00, 10.12.2008). Проапоптотический эффект данного токсического вещества показан на культуре опухолевых клеток и лимфоцитов, необходимы дальнейшие исследования влияния болиголова на жизнедеятельность нормальных клеток организма.

Авторы патента SG № 174455 (A1) (C12N 15/113, 28.10.2011) предлагают использовать микро РНК 128, участвующую в регуляции гена супрессора опухолей p53. Однако известно, что p53 является наиболее часто инактивированным регулятором апоптоза в опухолевых клетках. Таким образом, недостатком данного подхода в контексте опухолевой трансформации клеток является отсутствие адекватного ответа со стороны мутировавшего p53.

В изобретении AU № 2009322269 (A1) (А61К 31/496; А61Р 35/00; С07D 403/12, 30.06.2011) описано применение веществ, вызывающих ингибирование антиапоптотической функции протеина Bcl-2. Действительно, многие типы опухолей характеризуются повышенной экспрессией данного белка. При этом он является также обязательным компонентом баланса про- и антиапоптотических факторов в нетрансформированных клетках, что существенно ограничивает применение данного подхода. Использование данного подхода ограничено опухолями, характеризующимися повышенной экспрессией Bcl-2.

В качестве средства, стимулирующего апоптоз, описано применение тритерпеновых гликозидов из голотурий (Патент РФ № 2340349, А61К 36/18, А61К 47/10, А61Р 35/00, 10.12.2008), производных апогоссипола (патент US № 2011111057 (A1), А61К 31/02; А61К 31/05; А61К 31/075; А61К 31/11; А61К 31/122; А61К 31/225; А61К 31/337; А61К 31/353; А61К 31/357; А61К 31/453; А61К 31/65; А61К 33/24; А61Р 35/00; G01N 33/68, 12.05.2011), дексанабиола и его производных (Патент WO № 2011030106 (A1), А61К 31/352; А61Р 35/00, 17.03.2011), антипрогестина Патент YU № P29903 (A), А61К 31/57; А61Р 35/00; А61Р 43/00; С07J 7/00, 17.08.2006), ингибитора ФАК киназы PND-1186 (WO № 2011019943 (A1) МПК А61Р 35/00; С07D 413/02; С07D 413/04, 17.02.2011). Все указанные вещества не являются компонентами нормальной внутриклеточной сигнализации и могут быть токсичны для окружающих тканей. Однако на данный момент времени ассортимент средств для управления апоптозом недостаточен, а область их применения ограничена.

В настоящее время предложены различные способы активации апоптоза опухолевых клеток. Так, в качестве индуктора программированной гибели клеток было предложено использование специфических антисмысловых олигонуклеотидов специфичных к мРНК определенных генов, экспрессируемых опухолевыми клетками (Патент РФ № 2240125, А61К 31/7088, 20.11.2004). Показано, что модифицированные антитела-агонисты к DR-5 в сочетании с апоптоз-индуцирующими агентами синергетически индуцируют апоптоз раковых клеток (Патент РФ № 2379056, А61К 39/395, С07К 16/28, А61Р 35/00, 20.01.2010). Данный способ предлагает использование апоптоз-индуцирующих агентов, которые могут приводить к гибели нормальных клеток. Другими исследователями был запатентован способ, позволяющий специфически индуцировать апоптоз клеток, экспрессирующих TLR3-рецептор. Для этого используется агонист TLR3 в сочетании с интерфероном типа I в низкой дозе (Патент РФ № 2401661, А61К 31/713, А61К 38/21, А61Р 35/00, 20.10.2010). К недостаткам данного метода можно отнести ограничение его применения клетками несущими TLR3-рецептор, клоны клеток с другими дифференцировочными признаками будут не чувствительны к описанному воздействию.

Известно использование магнитного поля для селективной индукции апоптоза опухолевых клеток без воздействия на окружающие ткани и без индукции некроза (Патент РФ № 2200596, А61N 2/00, 20.03.2003). Описанный метод может быть использован в случае солидных опухолей с четкой локализацией, существенным минусом данного подхода является технические трудности его применения при опухолях клеток крови.

Заявленный в патенте US № 2011059189 (A1) (А61К 33/00; А61Р 31/12; А61Р 35/00, 10.03.2011) способ усиления апоптоза опухолей за счет воздействия на клетки модифицированного производного силиката натрия Na₈.2Si₄H₉.7O₁₇.6 включает, в том числе, увеличение продукции оксида азота, как проапоптотического агента. D.Vaуer предложил воздействовать на уровень внутриклеточного оксида азота путем ингибирования ферментов, ответственных за утилизацию NO (Патент US

№2009264398 (A1), A61K 31/337; A61K 31/397; A61P 35/00; C12Q 1/18, 22.10.2009).

Наиболее близким к предлагаемому является способ индукции апоптоза опухолевых клеток за счет повышения уровня оксида азота ("METHOD FOR INDUCING TUMOR POPTOSIS BY INCREASING NITRIC OXIDE LEVELS" патент US №2009264398). Автор данного метода предлагает использовать ингибитор фермента NO-диоксигеназы, ответственного за утилизацию NO для увеличению уровня указанного газотрансмиттера в опухолевых клетках. Существенным недостатком данного способа является высокая способность оксида азота к окислению внутриклеточных молекул. Так, известно, что митохондрии содержат большое количество гемсодержащих, а также железо- и серосодержащих белков, с которыми NO (или ONOO-) активно соединяется (Реутов В.П. 2002. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности. Биохимия. 67 (3): 353-376). Воздействие оксида азота приводит к разобщению окислительного фосфорилирования на уровне цитохром оксидазы, увеличению количества супероксид аниона и к синтезу пероксинитрита при взаимодействии NO с супероксидом. Пероксинитрит ингибирует практически все компоненты электронной транспортной цепи, включая комплекс I (NADH дегидрогеназу), комплекс II (сукцинат дегидрогеназу), комплекс III (цитохром с редуктазу) и комплекс V (АТФ синтазу) путем окисления цистеина, нитрозилирования тирозина и повреждения Fe-S центров белков (Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. 2007. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 87:315-424). Также, показано, что пероксинитрит приводит к открытию пор индуктором апоптоза было выявлено в результате проведения экспериментальных исследований. В настоящее время известно, что внутриклеточные газы необходимы для функционирования практически всех органов и тканей. Монооксид углерода вовлечен в регуляцию тонуса сосудов и ангиогенеза, передачу импульсов в мозге, а также метаболизм ксенобиотиков в печеночной ткани. СО ингибирует про-воспалительные сигнальные пути и способствует индукции анти-инфламаторных и анти-пролиферативных механизмов [20]. В экспериментах с использованием нетрансформированных клеток показано, что СО ингибирует апоптоз. Антиапоптотический потенциал СО был впервые продемонстрирован в экспериментальных условиях при исследовании влияния данного газа на эндотелиальные клетки и β -клетки поджелудочной железы. Так, добавление в клеточные культуры экзогенного СО препятствовало TNF-индуцированному апоптозу мышечных фибробластов и эндотелиальных клеток. Подобный антиапоптотический эффект наблюдался в условиях *in vitro* при гиперэкспрессии гемоксигеназы-1 [21]. Показано, что СО защищает эндотелиальные клетки от TNF-опосредованного апоптоза за счет активации NF- κ B-зависимых антиапоптотических генов [22]. Однако монооксид углерода имеет проапоптотический эффект в отношении опухолевотрансформированных клеток. В экспериментах с использованием Jurkat клеток было показано, что СО усиливает клеточную смерть, активированную Fas/FasL или TRAIL лигандами [23]. На примере эндотелиальных клеток показано, что СО повышает продукцию оксида азота за счет Akt-опосредованного фосфорилирования eNOS, что может приводить к усилению апоптоза [24]. На сегодняшний день существует несколько потенциальных доноров монооксида углерода. CO-RM (СО-высвобождающие молекулы), группа соединений, являющихся донорами монооксида углерода и диссоциирующие с выделением СО в клетках (CORM-1 ($Mn_2(CO)_{10}$) и CORM-2 ($Ru(CO)_3Cl_2$ димер), CORM-3 и CORM-4). В своей работе мы использовали CORM-2, обладающий не только липофильностью, но и способностью быстро диссоциировать в растворе с образованием монооксида углерода [25].

Способ осуществляют следующим образом

0,5 мкл стокового 20 мМ раствора CORM-2 добавляют к 200 мкл клеточной суспензии опухолевых клеток линии Jurkat плотностью $1 \cdot 10^6$ клеток/мл для получения конечной концентрации 50 мкМ, и далее образцы культивируют в течение 24 ч в 5% CO_2 атмосфере при 37°C.

Пример на выполнение способа

T-лимфобластные клетки человека линии Jurkat (Всероссийский банк клеточных культур. Институт цитологии РАН, С.-Петербург) были культивированы в RPMI-1640 («Invitrogen», США) дополненной в соотношении 9:1 эмбриональной телячьей сывороткой («Gibco Invitrogen», США), 0,3 мг/мл L- глутамином и 100 мкг/мл гентамицином в 5% CO_2 атмосфере при 37°C, с оптимальной плотностью $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Оптимальную жизнеспособность клеток поддерживали пассажами через каждые три дня.

Мононуклеарные клетки выделяют из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования [Натвиг Дж. и соавт., 1980]. Венозную кровь, стабилизированную K_3EDTA в соотношении 2:1 наслаивают на градиент плотности Ficoll-Paque ($\rho=1,077$ г/см³) («Pharmacia», Швеция) и центрифугируют при 1500 об/мин в

течение 20 мин. Кольцо, образованное из смеси мононуклеарных лейкоцитов, собирают пипеткой с раздела фаз. Клетки трижды отмывают средой RPMI-1640, ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 1500 об/мин. Для определения жизнеспособности 7 мкл суспензии клеток смешивают со 140 мкл 0,5% трипанового синего («Serva», США), заполняют счетную камеру Горяева. Жизнеспособность клеток оценивают по содержанию «мертвых» клеток, окрашенных в синий цвет. Доля погибших клеток, содержащих краситель, не превышала 5%. Выделенные на градиенте плотности мононуклеары ресуспендируют в полной питательной среде (90% RPMI-1640, 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco Invitrogen», США), 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицин). Для стандартизации количества клеток суспензию мононуклеарных лейкоцитов разбавляют полной питательной средой до получения $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл среды.

Для определения жизнеспособности 7 мкл суспензии клеток смешивают с 70 мкл 0,5% трипанового синего («Serva», США) и 70 мкл 0,9% NaCl, а затем заполняют счетную камеру Горяева. Жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов оценивают по содержанию «мертвых» клеток, окрашенных в синий цвет. Доля погибших клеток, содержащих краситель, обычно, не превышает 5%.

Готовят стоковый раствор CORM-2 (Sigma, USA), для этого 1 мг указанного вещества добавляют к 100 мкл DMSO (Sigma, USA) для получения 20 мМ раствора. Для проведения эксперимента клетки линии Jurkat и мононуклеарные лейкоциты в концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл среды переносят в 96-луночные планшеты (по 200 мкл клеточной суспензии в 1 лунке), добавляют 0,5 мкл стокового раствора 20 мМ CORM-2 до получения конечной концентрации 50 мкМ. Экспериментальные образцы культивируют в течение 24 ч в 5% CO₂ атмосфере при 37°C.

Для подтверждения активации апоптоза клеток используют тесты - аннексиновый тест, определение содержания белков семейства Bcl-2, тест с оценкой числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом, определение уровня экспрессии генов, кодирующих белки семейства bcl-2.

Предлагаемые условия способа (концентрация, время и температура инкубации) основаны на результатах экспериментальных исследований.

Приводим результаты тестов, подтверждающих активацию апоптоза клеток линии Jurkat при использовании CORM-2 в указанной концентрации и экспозиции и температуре.

Аннексиновый тест. Количество апоптотических клеток определяли с помощью проточной цитофлуориметрии (Facs CantoII («Beckman Dickenson», США)) с использованием набора «ANNEXIN V FITC» («Abeam», США). Полученные результаты выражали в процентах (отношение числа клеток, связавших аннексины V и/или пропидий иодид к общему числу клеток).

В Таблице 1 приведены результаты аннексинового теста. Процент клеток, связавших аннексины V, отражает число клеток с апоптотическими изменениями. Пропидий иодид-положительные клетки являются некротизированным (van England). 50 мкМ концентрация CORM-2 вызывала апоптоз опухолевых клеток линии Jurkat и не влияла на жизнедеятельность небласттрансформированных клеток (мононуклеарные лейкоциты) (* - различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с интактной культурой). Указанная концентрация донора монооксида углерода не вызывала индукция некротического пути гибели клеток.

Оценка числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом.

Количество клеток со сниженным уровнем потенциала митохондриальных мембран ($\Delta\psi$) определяли с помощью проточной цитофлуориметрии (Facs CantoII («Beckman Dickenson», США)) с использованием набора «MitoScreen» («BD Pharmingen», США). Полученные результаты выражали в процентах (отношение числа клеток, со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом к общему числу клеток).

В Таблице 2 приведены результаты, характеризующие состояние митохондриальных мембран после воздействия донора CO (* - различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с интактной культурой). Полученные данные свидетельствуют о том, что донор монооксида углерода в концентрации 50 мкМ вызывает падение митохондриального трансмембранного потенциала клеток. Таким образом, был сделан вывод о том, что монооксид углерода вызывает активацию апоптоза за счет индукции митохондриального пути запуска программированной клеточной гибели.

Определение содержания белков семейства Bcl-2

Содержание белков bcl-2, bcl-x1 и bad определяли методом вестерн-блот. Равное количество цельноклеточных лизатов подвергали электрофорезу в 10% SDS полиакриламидном геле, затем осуществляли перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану. Далее мембрану блокировали 1% желатином, трижды промывали TTBS (20 мМ/л Tris HCl, pH 7,6, 137 мМ/л NaCl, и 0,05% Tween 20). Затем мембрану инкубировали с первичными антителами (anti-Bcl-XL («Sigma», США), anti-Bad

(«Biosource», США), anti-Bcl-2 («Biosource», США) в течение часа. Трижды промывали TTBS и добавляли вторичные антитела с пероксидазной меткой («Biosource», США). Для визуализации результатов исследования использовали хемилюминесцентный метод («NOVEX ECL Chemiluminescent Substrate Reagent kit», Invitrogen, США). Количественное содержание белков определяли путем подсчета интенсивности бенда на рентгеновской пленке с помощью программы TotalLab v.2.01. В качестве стандарта и внутреннего контроля использовали белок глицеро-3-фосфат-дегидрогеназы («Chemicon», США), выражая содержание исследуемых протеинов как отношение сигнала определяемого белка к сигналу белка глицеро-3-фосфат-дегидрогеназы в исследуемых образцах. На Фиг.1 показано изменение содержания белков семейства Bcl-2 при воздействии на клетки донора монооксида углерода.

Таким образом, проапоптотический эффект донора внутриклеточного газового трансмиттера CO опосредован дисбалансом в системе белков семейства Bcl-2 (повышением содержания проапоптотического белка Bad и снижением содержания антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xl).

Определение уровня экспрессии генов, кодирующих белки семейства bcl-2

Уровень экспрессии генов bcl-2, bcl-xl и bad определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-Time PCR). Суммарную РНК выделяли из клеток с использованием набора реагентов «QIAmp RNeasy mini Kit» (QIAGEN, Германия). Процедура обратной транскрипции проводили с использованием случайных гексапраймеров и MMuLV-обратной транскриптазы («Promega», США). Амплификацию кДНК исследуемых генов, а также анализ продуктов амплификации в режиме реального времени проводили на приборе Mini Opticon («BioRad», США) с использованием реакционной смеси с интеркалирующим красителем SYBR Green I («Molecular Probe», США). В качестве референсного гена использовали ген b-actine. Результаты выражали в условных единицах (отношение числа циклов амплификации исследуемого гена к количеству циклов амплификации референсного гена).

В Таблице 3 приведены результаты оценки экспрессии мРНК генов, кодирующих белки регуляторы апоптоза семейства bcl-2 (* - различия достоверны (p<0,05) по сравнению с интактной культурой).

Таким образом, индуцированное монооксидом углерода снижение содержания белков Bcl-2 и Bcl-xl происходит за счет снижения экспрессии мРНК соответствующих генов.

Статистический анализ результатов

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SPSS V.11.0 (SPSS, Chicago, USA). Различия считались достоверными при уровне значимости p<0,05.

Таким образом, донор монооксида углерода вызывает апоптоз клеток линии Jurkat, за счет изменения экспрессии и содержания белков, регулирующих целостность митохондриальных мембран. Использование донора монооксида углерода является физиологичным для управления апоптозом в рамках организма в случае создания лекарственных веществ на основании данного подхода.

	Число клеток линии Jurkat с некротическими признаками после 24 ч инкубации, %	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками после 24 ч инкубации, %	Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими признаками после 24 ч инкубации, %	Число мононуклеарных лейкоцитов с апоптотическими признаками после 24 ч инкубации, %
Интактные клетки	0 (0-0,15)	1,05 (0-1,55)	0,45 (0,35-0,75)	28,50 (24,85-29,3)
Клетки после воздействия 50 мкМ CORM-2	2,10 (1,7-2,35)	9,60 (8,9-10,1)*	7,00 (3,25-9,5)*	36,50 (32,7-41,3)

Количество клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом, %	
Интактные клетки линии Jurkat	1,1 (0,7-1,2)
Клетки линии Jurkat после воздействия мМ CORM-2	16,4 (15,9-18,5)*

	Экспрессия мРНК гена bcl-2, усл.д.	Экспрессия мРНК гена bcl-xl, усл.д.	Экспрессия мРНК гена bad, усл.д.
Интактные клетки линии Jurkat	5,84 (5,35-6,12)	9,92 (9,76-13,33)	3,1 (2,47-3,19)
Клетки линии Jurkat после воздействия 50 мкМ CORM-2	2,9 (1,51-4,78)*	3,36 (2,92-3,99)*	1,24 (0,75-1,64)*

Источники информации

1. Антонева И.И., Петров С.Б. Маркеры апоптоза и пролиферации опухолевых клеток по мере прогрессирования рака яичников // Онкология. - 2008. - Т.10. №2. - С.234-237

2. Абраменко И.В., Фильченков А.А., Оценка параметров апоптоза в диагностике

онкологических заболеваний, их прогнозе и оптимизации схем терапии // Вопросы онкологии. - 2003. - Т.49. - С.21-30

3. Патент РФ № 2340349 Опубликовано: 10.12.2008
4. Патент SG №174455 Опубликовано: 28.10.2011.
5. Патент AU 2009322269 Опубликовано: 30.06.2011
6. Патент РФ №2340349, Опубликовано: 10.12.2008
7. Патент US № 2011111057 Опубликовано: 12.05.2011
8. Патент WO № 2011030106 Опубликовано: 17.03.2011
9. Патент YUP № 29903 Опубликовано 17.08.2006
10. Патент WO №2011019943 Опубликовано: 17.02.2011
11. Патент РФ № 2240125, Опубликовано: 20.11.2004
12. Патент РФ № 2379056, Опубликовано: 20.01.2010
13. Патент РФ № 2401661, Опубликовано: 20.10.2010
14. Патент РФ № 2200596, Опубликовано: 20.03.2003
15. Патент US № 2011059189 Опубликовано: 10.03.2011
16. Патент US № 2009264398 Опубликовано: 22.10.2009 (прототип)
17. Реутов В.П. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности / Биохимия. - 2002. - Т.67. - №3. - С.353-376.
18. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease / *Physiol. Rev.* - 2007. - Vol.87. - P.315-424.
19. Vieira H.L., Belzac A.S., Haouzi D. The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, 4-hydroxynonenal / *Oncogene.* - 2001. - Vol.20. - P.4305-4316.
20. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? / *FASEB J.* - 2002. - Vol.16. - P.1792-1798.
21. Inguaggiato P., Gonzalez-Michaca L., Croatt A.J., Haggard J.J., Alam J., Nath K.A. Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis / *Kidney Int.* - 2001. - Vol.60. - P.2181-2191
22. Zuckerbraun B.S., Billiar T.R. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1 / *J. Exp. Med.* - 2003. - Vol.198. - P.1707-1716.
23. Song R., Zhou Z., Kim P.K., Shapiro R.A., Liu F., Ferran C., Choi A.M., Otterbein L.E. Carbon monoxide promotes Fas/CD95-induced apoptosis in Jurkat cells / *J Biol Chem.* - 2004. - Vol.279. - P.44327-44334.
24. Fujimoto H., Ohno M., Ayabe S., Kobayashi H., Ishizaka N., Kimura H., Yoshida K., Nagai R. Carbon monoxide protects against cardiac ischemia-reperfusion injury in vivo via MAPK and Akt-eNOS pathways / *Arterioscler Thromb Vase Biol.* - 2004. - Vol.24. - P.1848-1853
25. Hidaka A, Azuma YT, Nakajima H, Takeuchi T. Nitric oxide and carbon monoxide act as inhibitory neurotransmitters in the longitudinal muscle of C57BL/6J mouse distal colon // *J Pharmacol Sci.* - 2010. - Vol.112. - P.231-241.

Формула изобретения

1. Применение донора монооксида углерода - CORM-2 для индукции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.

2. Способ индукции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat, включающий культивирование опухолевых клеток с последующим введением индуктора, отличающийся тем, что культивируют опухолевые клетки линии Jurkat в полной питательной среде и вводят донор монооксида углерода CORM-2 в конечной концентрации 50 мкМ и последующей экспозиции в течение 24 ч в условиях 5% CO₂ и при температуре 37°C.

ИЗВЕЩЕНИЯ

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: **23.03.2018**

Дата внесения записи в Государственный реестр: **21.01.2019**

Дата публикации и номер бюллетеня: [21.01.2019](#) Бюл. №3