

На правах рукописи

СТАРИКОВА

Елена Григорьевна

**Молекулярные механизмы действия газовых
трансммиттеров при дизрегуляции апоптоза и
пролиферации клеток линии Jurkat**

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Томск – 2014

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

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор

**Рязанцева Наталья
Владимировна
Новицкий Вячеслав
Викторович**

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН,
заслуженный деятель науки РФ

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии опухолей Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский научно-исследовательский институт онкологии»

**Кондакова Ирина
Викторовна**

Доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярных механизмов свободно-радикальных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр клинической и экспериментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

**Меньщикова Елена
Брониславовна**

Доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патофизиологии и экспериментальной терапии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга»

**Зюзьков Глеб
Николаевич**

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (г. Москва)

Защита состоится 25 декабря 2014 г. на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (634050 г. Томск, Московский тракт, 2). С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета

Автореферат разослан «__» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Изучение нового класса сигнальных молекул, названных газотрансмиттерами, началось в 1986 году с открытия эндотелиального фактора релаксации сосудов. Этим веществом оказался монооксид азота – простая неорганическая молекула (все известные до этого времени гормоны, медиаторы и нейротрансмиттеры были соединениями органической природы). Группа газовых посредников продолжает расширяться и в настоящее время включает, помимо монооксида азота, окись углерода (CO) и сульфид водорода (H₂S) [Wang R., 2002].

Имеющиеся в литературе фактические данные не оставляют сомнений в необходимости синтеза газов для регуляции ряда жизненно важных функций организма. Внимание исследователей в настоящее время сосредоточено на возможности управления с помощью газовых трансмиттеров различными патологическими и физиологическими процессами, в частности, апоптозом и пролиферацией «здоровых» и опухолевых клеток.

Баланс соотношения программируемая клеточная гибель – пролиферация является основополагающим фактором эмбрионального развития организма, функции быстро делящихся тканей, поддержании клеточного гомеостаза организма. При этом повреждения указанных ключевых физиологических и патофизиологических процессов могут возникать как на этапе трансдукции сигнала (транскрипционные факторы, семейство MAP-киназ), так и на уровне эффекторных молекул (циклин-зависимые киназы, семейство каспаз).

Степень разработанности. В настоящее время не установлено, являются ли регуляторные элементы апоптотического процесса и прогрессии фаз клеточного цикла мишенями действия газовых трансмиттеров NO, CO и H₂S. Показано, что оксид азота обладает проапоптотическим эффектом благодаря своей способности подавлять синтез белка Bcl-2 и увеличивать экспрессию Bax в митохондриях, провоцируя повышение проницаемости митохондриальной мембраны и выход в цитоплазму клетки цитохрома c [Hortelano S. et al; 2002]. С другой стороны, в ряде работ описаны диаметрально противоположные эффекты оксида азота на развитие программированной клеточной гибели. Так, активация NO/цГМФ-зависимого пути отменяла развитие апоптоза. Кроме того, блокирование апоптоза может быть связано с нитрозилированием каспаз [Török N.J. et al., 2002; Maejima Y. et al., 2005]. Продемонстрировано, что CO обладает антисуицидальным и антипролиферативным эффектом, который реализуется за счет активации семейства MAP киназ, в частности p38 киназы [Song R. et al., 2002]. Также CO ингибирует экспрессию мРНК циклина A и блокирует Cdk2, тем самым вызывая остановку клеточного цикла гладкомышечных клеток в G₁-фазе [Brouard S. et al., 2000]. CO влияет на активность апоптоза за счет снижения активности p53, каспазы 3 и 8 [Song R. et al., 2004]. Однако следует отметить, что молекулярные механизмы этих явлений не достаточно изучены. Установлено, что H₂S может иметь как индуцирующее, так и ингибирующее воздействие на процессы реализации апоптоза и пролиферации клеток [Kasperek M.S. et al., 2008]. Молекулярные мишени, детерминирующие

характер клеточного ответа на воздействие H_2S , в настоящее время не определены.

Таким образом, данные, характеризующие молекулярные механизмы влияния NO , CO и H_2S на реализацию запрограммированной гибели клеток и прогрессию фаз клеточного цикла, малочисленны и требуют дальнейшего изучения.

Цель исследования. Установить роль внутриклеточных газовых транмиттеров (NO , CO и H_2S) в механизмах дизрегуляции апоптоза и пролиферации опухолевых клеток линии Jurkat.

Задачи исследования:

1. Оценить общие закономерности и особенности влияния доноров газовых транмиттеров NO , CO и H_2S на апоптоз и пролиферацию мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови здоровых доноров, и опухолевых клеток линии Jurkat с учетом времени инкубации клеток; выявить дозозависимые эффекты доноров газов NO , CO и H_2S (SNP, NOC-5, CORM-2, NaHS) *in vitro*.
2. Определить вовлеченность редокс-зависимых сигнальных систем (активные формы кислорода, белок p53, экспрессия мРНК генов *bax* и *p21*) в опосредуемую донорами газовых транмиттеров NO , CO и H_2S регуляцию апоптоза и клеточного цикла опухолевых клеток линии Jurkat *in vitro*.
3. Выявить молекулярные механизмы изменения содержания проапоптотических (*Bad*) и антиапоптотических (*Bcl-2*, *Bcl-x_L*) белков, а также роль дисбаланса белков системы *Bcl-2* в регуляции митохондриального пути апоптоза, опосредованного донорами газовых транмиттеров NO , CO и H_2S , в опухолевых клетках линии Jurkat *in vitro*.
4. Оценить вовлеченность митохондриального, TNFR1-опосредованного путей регуляции апоптоза, белков-ингибиторов каспаз *xIAP* и *Aven* в активацию каспаз 3 и 9 в опухолевых клетках линии Jurkat при действии доноров газовых транмиттеров NO , CO и H_2S *in vitro*.
5. Определить участие доноров газовых транмиттеров NO , CO и H_2S в регуляции G_1 -фазы клеточного цикла (циклин *D1*, циклин-зависимая киназа 4, *pRb*, *p21*) *in vitro* в клетках линии Jurkat.
6. Установить p38 MAPK-зависимые механизмы действия доноров газов NO , CO и H_2S *in vitro* в регуляции апоптоза и клеточного цикла в клетках линии Jurkat.

Научная новизна. Получены приоритетные данные о роли газовых транмиттеров (NO , CO и H_2S) в молекулярных механизмах дизрегуляции апоптоза и пролиферации клеток. Показано, что проапоптотический эффект доноров газов определяется типом клеток, временем воздействия и используемой концентрацией. Установлено, что проапоптотические концентрации доноров газов обладают антипролиферативным действием. При

этом сульфид водорода обладает способностью останавливать опухолевые клетки в G₁-фазе клеточного цикла в дозе, не вызывающей апоптоз.

Показано, что изменение содержания ряда регуляторных протеинов при действии доноров оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода не зависит от экспрессии соответствующих генов. Продемонстрировано, что отсутствие активации каспазы 9 в случае использования донора NO ассоциировано с повышением содержания протеинов xIAP и Aven. Получены оригинальные данные, свидетельствующие о том, что снижение экспрессии генов и остановка клеток в G₁-фазе клеточного цикла при действии доноров газов происходит на фоне активации редокс-зависимых механизмов. Установлено, что донор сульфид водорода обладает антипролиферативным эффектом, реализуемым за счет специфической регуляции элементов G₁-фазы клеточного цикла. Впервые изучены p38 MAPK-зависимые молекулярные мишени действия газовых трансммиттеров. Показано, что увеличение внутриклеточного содержания протеинов при действии доноров оксида азота и сульфида водорода требует фосфорилирования за счет p38 MAPK. P38 митоген-активируемая киназа является трансммиттером как про- так и антиапоптотических изменений, суммирующихся в активацию апоптоза при действии доноров оксида азота и сульфида водорода и его угнетение при действии донора монооксида углерода.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в результате проведенного исследования фактические данные раскрывают молекулярные механизмы влияния газовых трансммиттеров оксида азота, сульфида водорода и монооксида углерода на клеточный гомеостаз. Определено, что доноры оксида азота и сульфида водорода изменяют содержание белков, участвующих в реализации апоптоза и прогрессии фаз клеточного цикла, за счет экспрессионно-независимых механизмов. Донор сульфида водорода при использовании в микромолярных концентрациях не приводит к изменению редокс-статуса клетки и является причиной остановки клеточного цикла в G₁-фазе. АФК-опосредованная активация p38 MAPK при действии на клетки донора монооксида углерода обуславливает снижение экспрессии генов. Основные положения исследования могут служить основой для дальнейшего изучения NO-, CO- и H₂S-опосредованной посттрансляционной модификации белков и значимости данного механизма в различных физиологических и патологических состояниях. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о нецелесообразности использования доноров оксида азота в качестве проапоптотических агентов в связи с их способностью увеличивать внутриклеточное содержание протеинов-ингибиторов каспаз. Установлено, что в условиях воздействия донора монооксида углерода p38 MAPK проявляет антиапоптотическую активность. Результаты, полученные при изучении антипролиферативных свойств донора сульфида водорода, сопряженные с регуляцией элементов G₁-фазы могут послужить основой для разработки новых технологий коррекции клеточного гомеостаза при опухолевом перерождении клеток.

Методология и методы исследования. В исследование были включены мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров, и клеточная линия Jurkat (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург). В качестве доноров внутриклеточных газовых трансмиттеров применялись нитропруссид натрия (SNP) и 3-(аминопропил)-1-гидрокси-3-изопропил-2-оксо-1-триазин (NOC-5), гидросульфид натрия (NaHS), а также Ru(CO)₂Cl₂ димер (CORM-2).

Исследование было разделено на несколько последовательных этапов. Целью первого этапа исследования являлась оценка способности газов влиять на апоптоз и клеточный цикл «здоровых» и бласттрансформированных клеток.

На втором этапе исследования с использованием специфического ингибитора SB203580 оценивали роль p38 MAPK в опосредованной газами регуляции апоптоза и пролиферации клеток. Кроме того, исследовали вовлеченность редокс-зависимых сигнальных путей в регуляторное действие газов. Вторым этапом исследования предполагал изучение молекулярных механизмов реализации апоптоза (активность каспаз 3 и 9, содержание белков-регуляторов митохондриальной проницаемости семейства Bcl-2 и протеинов-ингибиторов каспаз xIAP и Aven, TNF-опосредованный путь) и регуляции G₁-фазы клеточного цикла (циклин D1, Cdk4, pRb, p21).

Оценку выраженности некротических и апоптотических изменений клеток, распределение клеток по фазам клеточного цикла, презентацию на мембранах клеток рецепторов к TNF- α , количество клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом определяли методом проточной лазерной цитофлуориметрии; экспрессию генов xiap, aven, bcl-2, bcl-X_L, вах, bad, циклина D1 и p21 оценивали методом ПЦР в режиме реального времени; содержание белков xIAP, AVEN, Bcl-2, Bcl-X_L, Bad, циклин D1, pRb, Cdk4, p21, p53 определяли методом вестерн-блоттинга, секрецию клетками TNF- α изучали с помощью иммуноферментного анализа, активность каспазы 3 и каспазы 9 оценивали методом спектрофотометрического анализа. Результаты проведенного исследования подвергали статистической обработке.

Положения, выносимые на защиту:

1. Действуя *in vitro*, доноры газовых трансмиттеров (SNP, NOC-5, NaHS, CORM-2) обладают избирательным проапоптотическим и дозозависимым эффектом в отношении опухолевых клеток линии Jurkat и не оказывают проапоптотического эффекта в отношении мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров.
2. Проапоптотическое действие доноров оксида азота (100 мМ SNP и 100 мкМ NOC-5) в отношении клеток линии Jurkat, а также способность изменять продолжительность G₁-фазы клеточного цикла обусловлены повышением внутриклеточной продукции АФК с активацией редокс-зависимых сигнальных систем. Донор оксида азота (100 мкМ NOC-5) способен увеличивать содержание протеинов-ингибиторов каспаз, что может быть причиной отсутствия активации каспазы 9 на фоне запуска митохондриального пути апоптоза в клетках линии Jurkat *in vitro*.
3. Активация апоптоза при действии на клетки линии Jurkat донора монооксида углерода (50 мкМ CORM-2) происходит за счет p38 MAPK-

зависимого снижения экспрессии генов и уменьшения содержания соответствующих протеинов. Остановка клеток в G₁-фазе клеточного цикла при действии донора монооксида углерода (50 мкМ CORM-2) происходит на фоне активации редокс-зависимых сигнальных систем в клетках линии Jurkat.

4. Донор сульфида водорода, действуя в проапоптотической концентрации (10 mM NaHS), является патогенетическим фактором повышения уровня АФК и запуска редокс-зависимых сигнальных путей в клетках линии Jurkat. Действие донора сульфида водорода на фоне повышения уровня АФК приводит к запуску митохондриального пути апоптоза при увеличении содержания как про-, так и антиапоптотических протеинов семейства Bcl-2.
5. Замедление G₁-фазы клеточного цикла при действии проапоптотической концентрации донора сульфида водорода (10 mM NaHS) на клетки линии Jurkat обусловлено повышением содержания белков-промоторов клеточного цикла. Остановка клеток линии Jurkat в G₁-фазе при действии микромолярной дозы донора сульфида водорода (50 мкМ NaHS) происходит за счет его влияния на ключевые регуляторные молекулы.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением работы с использованием современных и высокотехнологичных молекулярно-биологических методов исследований, а также адекватных и современных методов анализа и статистической обработки результатов.

Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на V Международной (XIV всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (г. Москва, 2010); 6-ом Международном конгрессе по патофизиологии «Gene-environment interaction in health and disease» (Montreal, Canada, 2010); Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 2010, 2011); V региональной конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева, «Актуальные вопросы экспериментальной и практической онкологии» (г. Томск, 2010); Второй Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (г. Санкт-Петербург, 2011), Первой Европейской конференции, посвященной биологии сульфида водорода (Словакия, 2012).

Исследования поддержаны грантами в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» «Роль внутриклеточных газовых транзиттеров в регуляции гомеостаза клетки» (ГК № П1311), «Разработка технологии селективного управления внутриклеточной газовой сигнализацией» и "Селективная модуляция внутриклеточной коммуникации как основа молекулярных технологий управления функциями клеток" (ГК № 02.740.11.5031 и ГК 14.740.11.0932, соответственно), ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным

направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (ГК № 16.512.11.2087), а также Советом по грантам при Президенте РФ для поддержки ведущих научных школ РФ в рамках проектов «Идентификация молекулярных мишеней регуляции апоптоза и дифференцировки клеток крови при патологии инфекционного и неинфекционного генеза» (НШ-614.2012.7) и ««Роль генетически детерминированных реакций системы крови в патоморфозе инфекционных заболеваний»» (НШ-2334.2008.7). Получен патент «Средство и способ индукции апоптоза опухолевых клеток» №2488408 от 27.07.2013г. (Старикова Е.Г., Васильева О.А., Таширева Л.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В.).

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедр патофизиологии (раздел «Патофизиология тканевого роста»), молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики (раздел «Молекулярные основы патологии»), морфологии и общей патологии (раздел «Типовые патологические процессы») ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 27 работ, из них 14 – в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 1 – в зарубежном рецензируемом журнале, цитируемом в Web of Science и Web of Knowledge, 1 патент РФ на изобретение.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 237 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы, включающего 336 источников - 21 отечественный и 315 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 24 таблицами и 38 рисунками.

Личный вклад автора. Автором сформулированы цель и задачи исследования, проведена работа по анализу отечественной и зарубежной литературы, отражающей современное состояние исследований по данной научной проблеме, определен методологический подход, позволяющий наиболее полно решить поставленные в исследовании задачи, самостоятельно выполнен весь комплекс запланированных методов, проведена интерпретация результатов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с поставленными целью и задачами исследования были использованы три модели, необходимые для выяснения роли каждого газового трансмиттера (оксид азота, монооксид углерода, сульфид водорода) в регуляции клеточного гомеостаза.

Исследование, предполагающее наличие трех изолированных моделей, было разделено на несколько последовательных этапов. Целью первого этапа исследования являлась оценка способности газов влиять на апоптоз и клеточный цикл «здоровых» и бласттрансформированных клеток. Для этого

мононуклеарные лейкоциты, полученные из венозной крови здоровых доноров, и опухолевые клетки Т-лимфобластной лейкемии культивировали с различными дозами доноров газов. Оценивались характер клеточного ответа через 15 мин после действия доноров газотрансмиттеров, а также отсроченная реакция через 24 ч.

На втором этапе исследования с использованием специфического ингибитора SB203580 оценивалась роль p38 MAPK в опосредованной газами регуляции апоптоза и пролиферации клеток. Кроме того, исследовали вовлеченность редокс-зависимых сигнальных путей в регуляторное действие газов. Для этого оценивали уровень внутриклеточной продукции АФК, а также содержание редокс-зависимого транскрипционного фактора p53 и экспрессию его генов-мишеней (bax, p21). Второй этап исследования предполагал изучение молекулярных механизмов реализации апоптоза (активность каспаз 3 и 9, содержание белков-регуляторов митохондриальной проницаемости семейства Bcl-2 и протеинов-ингибиторов каспаз xIAP и Aven, TNF-опосредованный путь) и регуляции G₁-фазы клеточного цикла (циклин D1, Cdk4, pRb, p21). С использованием количественных методов изучения уровня экспрессии мРНК генов и содержания соответствующих протеинов оценивали молекулярные механизмы, лежащие в основе изменения уровня белков-регуляторов апоптоза и клеточного цикла в трех изолированных моделях действия на клетки доноров газовых трансмиттеров. Определяли p38 MAPK-зависимые и независимые мишени действия газов (таблица 1).

В соответствии с дизайном исследования для идентификации чувствительных к воздействию газотрансмиттеров клеток тестировались следующие клеточные линии:

1. Мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров

В диссертационное исследование были включены 26 здоровых доноров в возрасте от 18 до 50 лет (мужчины - 10, женщины – 16) (заключение этического комитета ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава №1183 от 01.03.2010).

Материалом для исследования служила венозная кровь, взятая утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл и стабилизированная КЗЭДТА.

2. Клетки линии Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия)

Данные клетки получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург).

Исследование проводилось на базе Научно-образовательного центра молекулярной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (научный руководитель – д-р мед.наук, профессор Н.В. Рязанцева).

Т-лимфобластные клетки человека линии Jurkat были культивированы в RPMI-1640 («Invitrogen», США), дополненной в соотношении 9:1 эмбриональной телячьей сывороткой («GibcoInvitrogen», США), 0,3 мг/мл L-глутамином и 100 мкг/мл гентамицином в 5% CO₂ атмосфере при 37⁰С, с оптимальной плотностью 1*10⁶ клеток/мл. Мононуклеарные клетки выделяли из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования [Натвиг Дж. и соавт., 1980]. Венозную кровь, стабилизированную КЗЭДТА в соотношении 2:1, наслаивали на градиент плотности Ficoll-Paque (ρ=1,077

г/см³) («Pharmacia», Швеция) и центрифугировали при 900g в течение 20 мин. Кольцо, образованное из смеси мононуклеарных лейкоцитов, собирали пипеткой с раздела фаз.

Таблица 1

Распределение экспериментальных образцов в соответствии с методами исследования

| Методы | Клеточные линии | Экспериментальные модели | | | |
|---|--|---|----------------------------------|--|--------------------------------------|
| | | Клетки, не подверженные воздействию доноров газов | Воздействие доноров оксида азота | Воздействие донора монооксида углерода | Воздействие донора сульфида водорода |
| Оценка апоптоза клеток в аннексиновом тесте с использованием проточной лазерной цитофлуориметрии | Мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров | 26 | 26 | 26 | 26 |
| | Культура клеток линии Jurkat | 26 | 12 | 12 | 12 |
| | Культура клеток линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK | 26 | 12 | 12 | 12 |
| Оценка распределения клеток по фазам клеточного цикла с использованием проточной лазерной цитофлуориметрии | Культура клеток линии Jurkat | 26 | 12 | 12 | 12 |
| | Культура клеток линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK | 26 | 12 | 12 | 12 |
| Оценка количества клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом с использованием проточной лазерной цитофлуориметрии | Культура клеток линии Jurkat | 26 | 12 | 12 | 12 |
| | Культура клеток линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK | 26 | 12 | 12 | 12 |
| Оценка уровня АФК с использованием проточной лазерной цитофлуориметрии | Культура клеток линии Jurkat | 26 | 12 | 12 | 12 |
| | Культура клеток линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK | 26 | 12 | 12 | 12 |
| Оценка активности каспазы-3 и -9 методом спектрофотометрии | Культура клеток линии Jurkat | 26 | 12 | 12 | 12 |
| | Культура клеток линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK | 26 | 12 | 12 | 12 |

Продолжение таблицы 1

| Методы | Клеточные линии | Экспериментальные модели | | | |
|--|--|---|----------------------------------|--|--------------------------------------|
| | | Клетки, не подверженные воздействию доноров газов | Воздействие доноров оксида азота | Воздействие донора монооксида углерода | Воздействие донора сульфида водорода |
| Исследование содержания белков-регуляторов апоптоза (Bad, Bcl-2, Bcl-X _L , Aven и xIAP) и клеточного цикла (циклин D1, p21, Cdk4, pRb, p53) с использованием метода вестерн-блоттинг | Культура клеток линии Jurkat | 26 | 12 | 12 | 12 |
| | Культура клеток линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK | 26 | 12 | 12 | 12 |
| Оценка экспрессии мРНК генов белков-регуляторов апоптоза (bad, bax, bcl-2, bcl-X _L , aven и xIAP)) и клеточного цикла (циклин D1, p21) с использованием метода ПЦР в реальном времени | Культура клеток линии Jurkat | 26 | 12 | 12 | 12 |
| | Культура клеток линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK | 26 | 12 | 12 | 12 |
| Определение количества TNFR1-презентирующих клеток с использованием проточной лазерной цитофлуориметрии | Культура клеток линии Jurkat | 26 | 12 | 12 | 12 |
| | Культура клеток линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK | 26 | 12 | 6 | 6 |
| Оценка содержания TNF α в супернатантах культур методом иммуноферментного анализа | Культура клеток линии Jurkat | 26 | 12 | 6 | 6 |
| | Культура клеток линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK | 26 | 12 | 6 | 6 |

Клетки трижды отмывали средой RPMI-1640, ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 900g. Выделенные на градиенте плотности мононуклеарные лейкоциты ресуспендировали в полной питательной среде (90% RPMI-1640, 10% эмбриональной телячьей сыворотки («GibcoInvitrogen», США), 0,3 мг/мл L- глутамина, 100 мкг/мл гентамицина).

Для определения жизнеспособности 7 мкл суспензии клеток смешивали с 70 мкл 0,5% трипанового синего («Serva», США) и 70 мкл 0,9% NaCl, а затем заполняли счетную камеру Горяева. Доля погибших клеток, содержащих краситель, не превышала 5%.

Для определения влияния газов на процессы реализации апоптоза и пролиферации клеток клеточную линию Jurkat и выделенные мононуклеарные лейкоциты крови культивировали в стерильных 96-луночных круглодонных иммунологических планшетах. В лунки планшетов вносили суспензию клеток и добавляли доноры исследуемых газовых транзиттеров. Конечная концентрация CORM-2 и NOC-5 составляла 5, 50, 100 и 500 мкМ; SNP и NaHS – 5, 50, 100 и 500 мкМ, 1, 10, 50, 100 и 500 мМ. Концентрации доноров внутриклеточных газовых транзиттеров выше 100 мМ (1М и 5М) не использовались, поскольку вызывали появление большого процента некротических клеток, выявляемых при окраске 0,5% трипановым синим («Serva», США). Клетки инкубировали в течение 15 мин и 24 ч при температуре 37°C и 5% CO₂.

Роль p38 MAPK в опосредуемых газовыми транзиттерами процессах регуляции апоптоза и клеточного цикла оценивалась с помощью селективного ингибитора p38 MAP-киназы SB 203580 в концентрациях от 0,02 до 2,0 мкМ и время воздействия 30 мин, являющихся, по данным литературы, оптимальными для ингибирования p38 MAPK [Saklatvala J., 1996].

Оценку количества клеток, вступивших в апоптоз, проводили с использованием FITC-меченного аннексина V и пропидиума йодида (PI) («Abcam», США) на проточном цитофлуориметре (Fax Canto2 («BecktonDickenson», США)). Распределение клеток по фазам клеточного цикла оценивали после пермеабиллизации клеточных мембран и окрашивания ядер с использованием набора CycleTestKit («BD Bioscience», США) с помощью проточной лазерной цитометрии. Содержание АФК в клетках изучали методом проточной цитофлуориметрии с использованием красителя с заблокированной флуоресценцией – дихлорфлуоресцеинадиацетата («Sigma Aldrich», США). Количество клеток со сниженным мембранным митохондриальным потенциалом ($\Delta\psi$) регистрировали с помощью набора реагентов «MitoScreen» («BD Pharmigen», США). Содержание клеток, презентующих на своей поверхности мембранную форму рецептора к фактору некроза опухоли- α 1-го типа TNF-RI (CD120), в культуре клеток линии Jurkat определяли методом лазерной проточной цитофлуориметрии с использованием антител, меченных FITC, к данному рецептору («Beckman Coulter», Франция).

Продукцию TNF α определяли путем оценки его концентрации в супернатантах клеточных культур методом твердофазного иммуноферментного анализа по инструкции, предлагаемой производителем тест-систем («Invitrogen», США).

Для количественного определения уровня экспрессии мРНК генов *xiar*, *aven*, *bcl-2*, *bcl-X_L*, *bax*, *bad*, *p21* и циклин D1 в клетках линии Jurkat был использован метод ПЦР в режиме реального времени. Выделение тотальной РНК из клеток осуществляли сорбентно-колоночным методом (QIAmp RNA

Blood mini Kit, QIAGEN, Германия) согласно прилагаемой инструкции. Следующим шагом синтезировали кДНК на матрице мРНК при участии обратной транскриптазы. Полученный фрагмент кДНК амплифицировали методом ПЦР в режиме реального времени с использованием SYBR Green I («Molecular Probe», США) на амплификаторе Mini Opticon («Bio-Rad», США). Результаты выражали в условных единицах (отношение числа циклов амплификации исследуемого гена к количеству циклов амплификации генов «домашнего хозяйства»).

Активность каспаз 3 и 9 оценивали с помощью спектрофотометрического метода с использованием наборов фирмы «Abscam» (USA). Метод основан на детекции хромофора р-нитроанилида (pNA), высвобождающегося после расщепления субстратов DEVD-pNA каспазой-3 и LEHD-pNA каспазой-9.

Для определения содержания белков-регуляторов апоптоза (Bcl-2, Bcl-XL, Bad, Aven, XIAP) и клеточного цикла (p53, p21, pRb, Cdk4, циклин D1) был применен метод вестерн-блоттинга. Образцы для анализа получали путем лизирования клеток. Белки разделяли по молекулярной массе методом электрофореза в SDS-полиакриламидном геле – 5%-ом концентрирующем (0,13 мМ Tris-HCl, pH=6,8) и 10%-ом разделяющем (375 мМ Tris-HCl, pH=8,8) под действием электрического поля (10 В/см пути). Далее белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) в течение 80-90 мин при силе тока 50-60 мА. Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с первичными антителами к Bcl-X_L, Aven, XIAP, pRb, циклин D1 («Sigma-Aldrich», США), Cdk4, Bcl-2, Bad, p53, p21 («Biosource», США) в разведении 1:200. Добавляли вторичные антитела с пероксидазной меткой («Biosource», США). Для визуализации результатов исследования использовали хемилюминесцентный метод.

Количественное содержание белков определяли путем подсчета интенсивности бэнда на рентгеновской пленке с помощью программы TotalLab v.2.01. В качестве стандарта и внутреннего контроля использовали белок глицеро-3-фосфат-дегидрогеназу (АТ фирмы «Chemicon», США), выражая содержание исследуемых протеинов в усл. ед. (отношение сигнала определяемого белка к сигналу белка глицеро-3-фосфат-дегидрогеназы в исследуемых образцах) [Dazard J.E., 2003].

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез [Кремер Н.Ш., 2004]. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для каждой выборки вычисляли средневывборочные характеристики: медиану (Me), первый и третий квартили (Q1, Q3). Так как закон распределения исследуемых числовых показателей отличался от нормального, достоверность различий независимых выборок проверяли при помощи U-критерия Манна-Уитни (в случае парных независимых совокупностей), критерия Краскала-Уоллиса (в случае множественных независимых совокупностей). В случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением для оценки различий между зависимыми выборками применялся непараметрический критерий Вилкоксона.

Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [Кремер Н.Ш., 2004].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения апоптоза клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов в условиях действия доноров газов оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода *in vitro*

При реализации настоящего исследования нами был установлен факт зависимости вектора апоптотических изменений от дозы используемого донора газового трансммиттера, времени его экспозиции и типа клеток.

Для дальнейших исследований молекулярных механизмов влияния доноров газовых трансммиттеров на процессы реализации апоптоза нами были выбраны следующие концентрации данных веществ: 100 мМ SNP (время аппликации 15 мин), 10 мМ NaHS (время аппликации 15 мин), 100 мкМ NOC-5 (время аппликации 24 ч), 50 мкМ CORM-2 (время аппликации 24 ч) (рисунок 1).

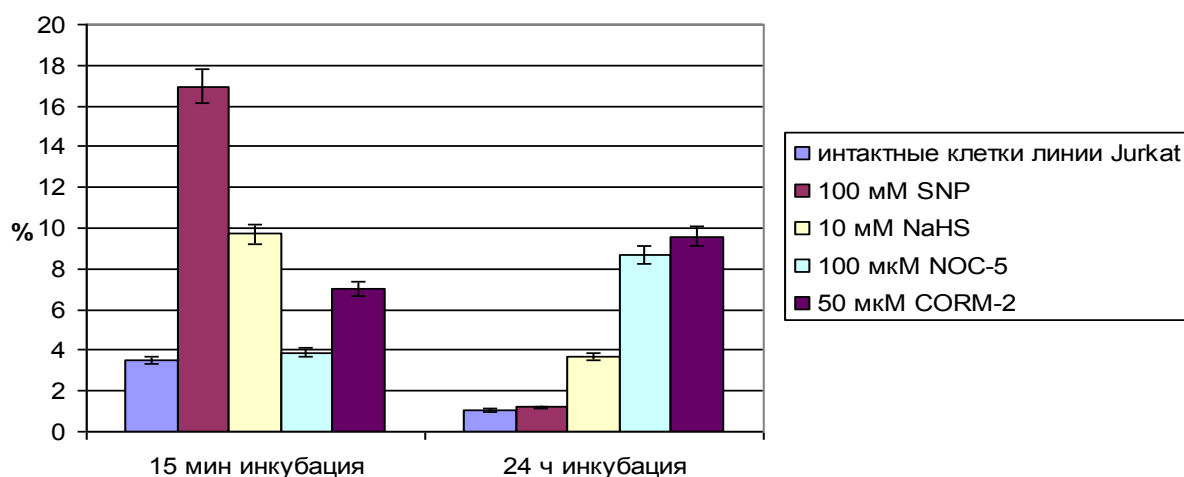


Рисунок 1 - Апоптотические изменения клеток линии Jurkat при действии доноров газовых трансммиттеров ($Me(Q_1-Q_3)$)

Отсутствие реакции со стороны апоптотической программы мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови здоровых доноров, по сравнению с активацией апоптоза опухолевых клеток в ответ на действие доноров газотрансммиттеров определяется разницей в балансе про- и антиапоптотических регуляторных молекул. Исследование молекулярных механизмов реализации суицидальной программы бласттрансформированных клеток при воздействии доноров газов позволило определить пути оперирования данных молекул при опухолевой трансформации клеток.

Молекулярные механизмы участия газовых трансмиттеров в дизрегуляции апоптоза и пролиферации опухолевых клеток

Распределение клеток по фазам клеточного цикла при воздействии доноров газов

Опухолевые клетки характеризуются коротким и неконтролируемым периодом пролиферации. Большинство онкогенных событий ведут к дизрегуляции клеточных процессов, ответственных за контроль клеточного цикла. Последний можно разделить на несколько стадий: G_1 - самая продолжительная стадия, в которой клетки подготавливаются к синтезу ДНК; S-период необходим для репликации ДНК; G_2 -стадия, в которой клетки подготавливаются к митозу; M-фаза представляет собой митотическое деление клеток.

Действие CO-высвобождающей молекулы на клетки линии Jurkat в течение 24 ч приводило к увеличению числа клеток в G_1 -фазе и их уменьшению в S-фазу, по сравнению с соответствующими показателями в контроле ($p < 0,05$). Количество клеток в G_2 -фазе клеточного цикла не отличалось от контрольных значений ($p > 0,05$) (рисунок 2). Таким образом, под влиянием донора монооксида углерода в клетках удлиняется G_1 -фаза клеточного цикла, что свидетельствует об антипролиферативном влиянии CO.

Совместное культивирование клеток линии Jurkat с донором оксида азота NOC-5 в концентрации 50 и 100 мкМ проводилось в течение 24 ч. Содержание клеток в G_1 -, S- и G_2 -фазах после инкубации с 50 мкМ донором оксида азота не отличалось от такового в интактной культуре ($p > 0,05$). Исходя из полученных нами данных, можно сделать вывод о том, что действие NOC-5 в концентрации 50 мкМ в течение 24 ч - не приводит к изменению продолжительности фаз клеточного цикла (рисунок 2). Вероятно, используемая концентрация донора оксида азота не влияет на молекулярные механизмы пролиферации клеток.

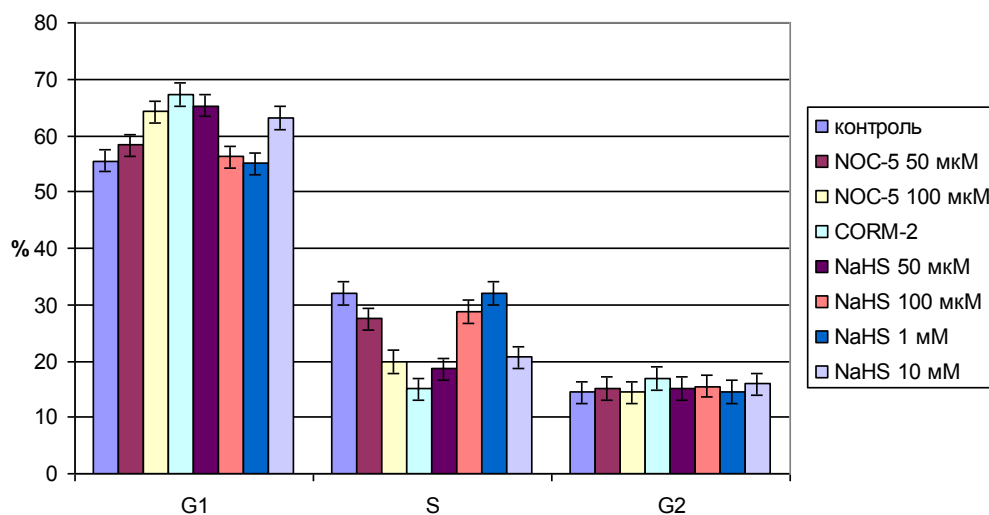


Рисунок - 2 Распределение клеток линии Jurkat по фазам клеточного цикла при действии доноров газотрансмиттеров, (Me(Q₁-Q₃))

При увеличении концентрации донора оксида азота в 2 раза (100 мкМ) *in vitro* после 24 ч воздействия было отмечено статистически значимое возрастание числа клеток, находящихся в G₁-фазе клеточного цикла, и уменьшение количества Т-лимфобластных лейкоцитов в S-фазе клеточного цикла ($p < 0,05$). Число клеток в G₂-фазе не изменилось в культурах, подвергшихся действию NOC-5 в концентрации 100 мкМ, по сравнению с таковым в контроле ($p > 0,05$) (рисунок 2). Данные результаты можно интерпретировать как достоверное увеличение продолжительности G₁-фазы клеточного цикла после суточного действия донора оксида азота NOC-5 в концентрации 100 мкМ.

Для определения роли сульфида водорода в распределении клеток по фазам клеточного цикла нами использовался NaHS в концентрациях 50, 500 мкМ, 1 и 10 мМ. Число клеток, находящихся в G₁-фазе клеточного цикла, возрастало в случае действия на культуру Т-лимфобластной лейкемии донора сульфида водорода в концентрациях 50 мкМ и 10 мМ, по сравнению с количеством их в контроле ($p < 0,05$). При этом выявлялось уменьшение числа клеток в S-фазе клеточного цикла при воздействии на клетки NaHS в концентрации 50 мкМ и 10 мМ относительно такового в интактной культуре ($p < 0,05$). 24-х часовая инкубация клеток с NaHS в концентрациях 50 мкМ и 10 мМ не приводила к изменениям числа клеток в G₂-фазе клеточного цикла относительно контроля ($p > 0,05$). Распределение Jurkat клеток по G₁-, S- и G₂-фазам клеточного цикла было сопоставимо с таковым в интактных клетках после действия донора сульфида водорода в концентрации 500 мкМ и 1 мМ ($p > 0,05$) (рисунок 2). Полученные результаты позволили предположить, что в основе антипролиферативного действия NaHS в концентрациях 50 мкМ и 10 мМ лежат разные молекулярные механизмы. Для подтверждения данной гипотезы необходимы дальнейшие исследования.

Участие редокс-сигнализации в опосредуемой газами дизрегуляции апоптоза и клеточного цикла в опухолевых клетках

Оксид азота имеет свободно-радикальную природу, а сульфид водорода и монооксид углерода могут нарушать функционирование митохондрий с последующей наработкой АФК, последние могут выступать в качестве вторичных мессенджеров в опосредованной газами регуляции апоптоза и пролиферации клеток.

Инкубация клеток с SNP в концентрации 100 мМ приводила к возрастанию уровня наработки АФК, по сравнению с аналогичным показателем в контроле ($p < 0,05$). Зарегистрированное нами увеличение продукции АФК свидетельствует о возникновении состояния окислительного стресса в условиях действия на клетки SNP в концентрации 100 мМ. Данное состояние поддерживается в клетках при инкубации с NOC-5 в концентрации 100 мкМ, о чем свидетельствовало увеличение содержания АФК при действии на клетки донора данного газа ($p < 0,05$). 15-ти минутное воздействие на клетки NaHS в концентрации 10 мМ также приводило к возрастанию уровня АФК, по

сравнению с содержанием его в интактных клетках ($p < 0,05$). Данные литературы убедительно свидетельствуют о том, что сульфид водорода обладает мощными восстановительными свойствами, защищая клетку от окислительного стресса [Kimura Y., Kimura H., 2004]. Применение NaHS в сверхвысокой (10 мМ) концентрации могло являться причиной нарушения митохондриального дыхания и увеличения уровня АФК. Нами было показано возрастание уровня АФК относительно такового в контроле при инкубации клеток с CORM-2 в концентрации 50 мкМ ($p < 0,05$). Суточная инкубация клеток с NaHS в концентрации 50 мкМ не приводила к изменению уровня АФК относительно контроля ($p > 0,05$) (таблица 2).

Таблица 2

Уровень продукции активных форм кислорода после действия доноров газов, Me(Q1-Q3)

| Условия эксперимента | Уровень АФК, усл. ед. |
|--------------------------------|--|
| Интактные клетки линии Jurkat | 563,0(499,5-585,0) |
| Действие SNP (100 мМ), 15 мин | 10314,0(10078,5-13693,5) ($p < 0,05$) |
| Действие NaHS (10 мМ), 15 мин | 2795,0(2776,5-3399,5) ($p < 0,05$) |
| Действие NOC-5 (100 мкМ), 24 ч | 604,0(600,5-938,5) ($p < 0,05$) |
| Действие CORM-2 (50 мкМ), 24 ч | 1322(1051-1334) ($p < 0,05$) |
| Действие NaHS (50 мкМ), 24 ч | 574(531,5-575) ($p > 0,05$) |

Примечание: $p < 0,05$ - по сравнению с интактными клетками линии Jurkat

Зарегистрированное нами повышение уровня АФК при действии доноров NO, CO и H₂S может быть недостаточным для изменения клеточного метаболизма. Ряд молекул, таких как транскрипционные факторы p53 и NIF-1, являются «биологическими маркерами», свидетельствующими о запуске редокс-сигнализации. Действие доноров оксида азота (100 мМ) и сульфида водорода (10 мМ) в течение 15 мин приводило к возрастанию внутриклеточного уровня белка p53, определенного методом иммуноблоттинга, по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Содержание p53 снижалось после действия на клетки NOC-5 (100 мкМ), CORM-2 (50 мкМ) и NaHS (50 мкМ) по сравнению с соответствующим значением в интактных клетках ($p < 0,05$) (рисунок 3). По данным литературы, p53 имеет короткий период полужизни и, в зависимости от типа клеток и природы стрессового сигнала, инактивируется в течение 6-20 мин MDM2 убиквитин-лигазой [Dornan D. et al., 2004]. Отсутствие повышения содержания p53 в клетках линии Jurkat после действия на них доноров NOC-5, CORM-2 и NaHS может быть обусловлено, на наш взгляд, образованием

комплекса p53-MDM2. В данном случае заключение об эффективной транскрипционной активности p53 может быть получено при измерении ответа генов–мишеней указанного фактора транскрипции.

Установлено, что p53 способен трансаktivировать гены, кодирующие проапоптотические белки семейства Bcl-2 (Bax, Noxa, Puma и Bid) [Nechushtan A. et al., 2001; Pavlov E.V. et al., 2001; Dejean L.M. et al., 2005]. Нами было отмечено возрастание, относительно значений в контроле, уровня экспрессии bax при действии на клетки SNP в концентрации 10 мМ и NOC-5 в концентрации 100 мкМ ($p < 0,05$). Однако действие CORM-2 в концентрации 50 мкМ и NaHS в концентрации 10 мМ не приводило к изменению значений показателя экспрессии bax относительно аналогичного параметра в интактных клетках ($p > 0,05$). В условиях наших экспериментов при инкубации клеточной культуры с донорами SNP, NOC-5, CORM-2 и NaHS в концентрации 10 мМ отмечалось достоверное повышение уровня экспрессии гена p21, по сравнению с интактными клетками ($p < 0,05$). Уровень экспрессии мРНК p21 не отличался от такового в контроле после воздействия на клеточную культуру NaHS в концентрации 50 мкМ ($p > 0,05$) (таблица 3).

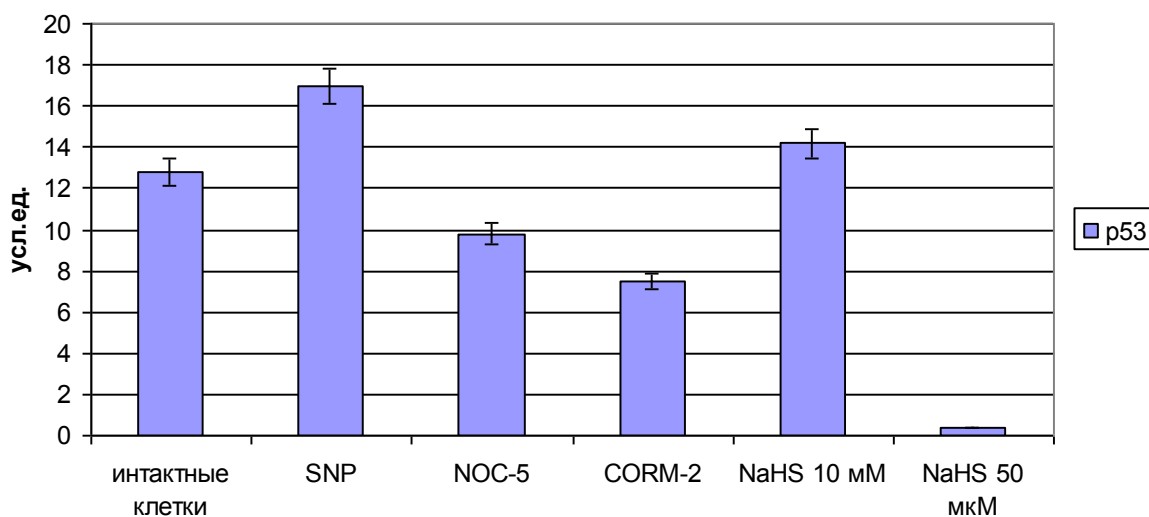


Рисунок 3 - Уровень транскрипционного фактора p53 после действия на клетки доноров газов (Me(Q₁-Q₃))

Таким образом, доноры газов NO (100 мМ SNP и 100 мкМ NOC-5), H₂S (10 мМ NaHS) и CO (50 мкМ CORM-2) в концентрациях, вызывающих повышение числа апоптотически-измененных клеток, индуцировали увеличение продукции АФК в клетках, достаточной для адекватной активации редокс-зависимых сигнальных систем. Действие донора сульфида водорода в концентрации 50 мкМ не приводило к увеличению АФК-продукции, что свидетельствовало о незаинтересованности редокс-зависимых сигнальных механизмов в регуляции клеточного цикла в случае действия на клетки NaHS в концентрации 50 мкМ.

Таблица 3

Экспрессия мРНК генов, кодирующих белки-регуляторы апоптоза и клеточного цикла, при действии на клетки линии Jurkat доноров газовых транзмиттеров, Me(Q₁-Q₃)

| Условия инкубации | Экспрессия гена bcl-2, усл.ед. | Экспрессия гена bcl-xl, усл.ед. | Экспрессия гена bad, усл.ед. | Экспрессия гена bax, усл.ед. | Экспрессия гена авен, усл.ед | Экспрессия гена хiар, усл.ед | Экспрессия гена р21, усл.ед | Экспрессия гена циклин D1, усл.ед |
|--|--|--|---|--|--|--|--|--|
| Интактные клетки линии Jurkat | 5,84 (5,35-6,12) | 9,92 (9,76-13,33) | 3,10 (2,47-3,19) | 0,91 (0,85-1,35) | 1,99 (1,63-2,0) | 4,97 (4,88-5,4) | 0,04 (0,01-0,06) | 1,50 (1,32-1,76) |
| Клетки после действия SNP (100 мМ) | 3,78 (3,76-3,8) p ₁ <0,05 | 1,83 (1,74-1,92) p ₁ <0,05 | 3,20 (3,00-3,40) p ₁ >0,05 | 3,03 (2,16-3,89) p ₁ <0,05 | 0,31 (0,3-0,32) p ₁ <0,05 | 0,24 (0,21-0,27) p ₁ <0,05 | 0,72 (0,65-0,80) p ₁ <0,05 | Не определялось |
| Клетки после действия SNP (100 мМ) и SB 203580 | 4,89 (4,35-5,51) p ₁ >0,05, p ₂ <0,05 | 2,73 (2,46-3,28) p ₁ <0,05, p ₂ <0,05 | 2,06 (2,0-2,09) p ₁ <0,05, p ₂ <0,05 | 0,73 (0,64-0,81) p ₁ <0,05, p ₂ <0,05 | 0,45 (0,37-0,46) p ₁ <0,05, p ₂ >0,05 | 0,92 (0,73-1,35) p ₁ <0,05, p ₂ <0,05 | 0,69 (0,57-0,74) p ₁ <0,05, p ₂ >0,05 | Не определялось |
| Клетки после действия NOC-5 (100 мкМ) | 0,79 (0,72-0,98) p ₁ <0,05 | 1,13 (0,98-1,26) p ₁ <0,05 | 39,80 (20,37-49,19) p ₁ <0,05 | 2,76 (2,37-3,29) p ₁ <0,05 | 2,28 (1,68-2,86) p ₁ >0,05 | 0,28 (0,23-0,38) p ₁ <0,05 | 0,51 (0,47-0,55) p ₁ <0,05 | 0,56 (0,37-0,98) p ₁ <0,05 |
| Клетки после воздействия NOC-5 (100 мкМ) и SB 203580 | 0,89 (0,49-1,08) p ₁ <0,05, p ₂ >0,05 | 1,86 (1,14-1,96) p ₁ <0,05, p ₂ >0,05 | 37,39 (31,86-43,12) p ₁ <0,05, p ₂ >0,05 | 2,08 (1,79-2,35) p ₁ <0,05, p ₂ >0,05 | 1,22 (0,74-1,71) p ₁ >0,05, p ₂ >0,05 | 0,55 (0,38-0,46) p ₁ <0,05, p ₂ >0,05 | 1,45 (1,28-1,63) p ₁ <0,05, p ₂ <0,05 | 2,51 (2,14-2,76) p ₁ <0,05, p ₂ <0,05 |

Продолжение таблицы 3

| Условия инкубации | Экспрессия гена bcl-2, усл.ед. | Экспрессия гена bcl-xl, усл.ед. | Экспрессия гена bad, усл.ед. | Экспрессия гена bax, усл.ед. | Экспрессия гена авен, усл.ед. | Экспрессия гена хіар, усл.ед. | Экспрессия гена р21, усл.ед. | Экспрессия гена циклин D1, усл.ед. |
|---|---|---|---|--|---|---|---|---|
| Клетки после действия CORM-2 (50 мкМ) | 2,90 (1,51-4,78) $p_1 > 0,05$ | 3,36 (2,92-3,99) $p_1 < 0,05$ | 1,24 (0,75-1,64) $p_1 < 0,05$ | 0,76 (0,41-1,17) $p_1 > 0,05$ | 2,71 (1,85-3,57) $p_1 > 0,05$ | 1,14 (0,82-1,58) $p_1 < 0,05$ | 0,52 (0,46-0,59) $p_1 < 0,05$ | 0,67 (0,57-0,69) $p_1 < 0,05$ |
| Клетки после действия CORM-2 (50 мкМ) и SB 203580 | 4,04 (4,01-5,29) $p_1 > 0,05$, $p_2 > 0,05$ | 6,95 (5,88-6,96) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 1,81 (1,72-2,49) $p_1 < 0,05$, $p_2 > 0,05$ | 0,48 (0,45-0,85) $p_1 > 0,05$, $p_2 > 0,05$ | 4,92 (4,87-5,86) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 4,89 (3,48-4,98) $p_1 > 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 0,35 (0,27-0,41) $p_1 < 0,05$, $p_2 > 0,05$ | 1,72 (1,64-1,93) $p_1 > 0,05$, $p_2 < 0,05$ |
| Клетки после действия NaHS (10 мМ) | 2,68 (1,94-3,17) $p_1 < 0,05$ | 1,57 (1,39-1,76) $p_1 < 0,05$ | 3,75 (3,50-3,93) $p_1 > 0,05$ | 0,20 (0,16-0,37) $p_1 < 0,05$ | 0,26 (0,22-0,28) $p_1 < 0,05$ | 0,20 (0,19-0,21) $p_1 < 0,05$ | 0,42 (0,37-0,50) $p_1 < 0,05$ | 0,62 (0,57-0,69) $p_1 < 0,05$ |
| Клетки после действия NaHS (10 мМ) и SB 203580 | 2,63 (2,46-3,59) $p_1 < 0,05$, $p_2 > 0,05$ | 5,17 (4,8-5,56) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 1,36 (1,27-1,59) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 0,002 (0,001-0,003) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 0,40 (0,36-0,53) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 0,17 (0,17-0,2) $p_1 < 0,05$, $p_2 > 0,05$ | 0,53 (0,47-0,63) $p_1 < 0,05$, $p_2 > 0,05$ | 2,41 (2,15-2,74) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ |
| Клетки после воздействия NaHS (50 мкМ) | Не определялось | Не определялось | Не определялось | Не определялось | Не определялось | Не определялось | 0,10 (0,05-0,14) $p_1 > 0,05$ | 0,54 (0,46-0,67) $p_1 < 0,05$ |

Примечание: $p_1 < 0,05$ - по сравнению с интактными клетками линии Jurkat; $p_2 < 0,05$ - по сравнению с изолированным действием газа

В проведенном нами исследовании с использованием специфического ингибитора p38 MAPK SB203580 определяли роль p38 митоген-активируемой киназы в проапоптотическом и антипролиферативном эффекте действия газовых трансммиттеров. Инкубация клеток линии Jurkat с SNP в концентрации 100 мМ, NOC-5 в концентрации 100 мкм и NaHS в концентрации 10 мМ с предварительно заингибированной p38 MAPK сопровождалась снижением количества клеток, вступивших в апоптоз, по сравнению с культурой клеток, обработанных только SNP ($p < 0,05$). Ингибирование p38 MAPK-зависимых путей проапоптотического действия донора монооксида углерода приводило к достоверному увеличению числа апоптотических клеток, по сравнению с культурой клеток, инкубированной только с CORM-2 ($p < 0,05$) (таблица 4).

Нами было установлено, что выключение p38 MAPK-опосредованных путей сигнальной трансдукции в клетках, обработанных NOC-5, CORM-2 и NaHS в обеих концентрациях, не отразилось на количестве клеток, вступивших в G₁-, S- и G₂-фазы клеточного цикла, по сравнению с культурами клеток, обработанными соответствующими донорами газов с действующей p38 MAPK ($p > 0,05$) (таблица 5).

Таким образом, сигнал к активации апоптоза посредством оксида азота и сульфида водорода передается с участием p38 MAPK. При этом p38 митоген-активируемая киназа обладала антиапоптотическим действием в контексте повышения внутриклеточной концентрации монооксида углерода.

Полученные данные позволили предположить, что профиль изменяемых за счет p38 MAPK внутриклеточных мишеней варьирует в зависимости от природы активирующего сигнала. Дальнейшее определение p38 MAPK-зависимых мишеней действия газов необходимо для объяснения различного вектора направленности апоптотической реакции при ингибировании p38 MAPK-зависимых путей действия доноров газовых трансммиттеров. Наряду с этим, нами было установлено, что p38 MAPK не участвует в опосредованной донорами газов регуляции клеточного цикла.

Молекулярные механизмы митохондриальной дисфункции при воздействии на клетки доноров газов

Известно, что смертнндуцирующие и жизнеоберегающие сигналы суммируются на уровне митохондриальных мембран. Когда летальные стимулы становятся преобладающими, через поры пермеабилзации из митохондрий в цитозоль выделяются различные проапоптотические факторы (цитохром *c*, Smac/DIABLO, AIF, эндонуклеаза G).

Пермеабилзация внутренней митохондриальной мембраны предполагает формирование пор или каналов, приводящих к рассеиванию митохондриального трансмембранного потенциала.

Нами было показано, что действие донора оксида азота SNP в течение 15 мин и NOC-5 в течение 24 ч приводило к многократному возрастанию числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом, по сравнению с аналогичным показателем в контроле ($p < 0,05$).

Число клеток с апоптотическими признаками, клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом, активность каспаз 3 и 9 в клетках линии Jurkat после ингибирования p38 MAPK-зависимых путей действия доноров газов, Me(Q1-Q3)

| Условия эксперимента | Число клеток с апоптотическими признаками, % | Число клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом, % | Активность каспазы-3, усл.ед. | Активность каспазы 9, усл.ед. |
|--|--|---|--|--|
| Интактные клетки | 3,50 (2,70-4,20) | 1,10(0,70-1,20) | 1,00(0,99-1,01) | 1,00(0,99-1,01) |
| Клетки после действия SNP (100 мМ) | 16,95(14,15 - 21,80) $p_1 < 0,05$ | 74,50(67,10-79,20) $p_1 < 0,05$ | 2,17(2,04-2,19) $p_1 < 0,05$ | 3,09(3,06-3,11) $p_1 < 0,05$ |
| Клетки после действия SB203580 и SNP (100 мМ) | 5,50(4,40-6,70) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 75,90(70,80-76,20) $p_1 < 0,05$, $p_2 > 0,05$ | 0,37 (0,31-0,42) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 0,92 (0,88-0,95) $p_1 > 0,05$, $p_2 < 0,05$ |
| Клетки после действия NaHS (10 мМ) | 9,70(8,83-14,90) $p_1 < 0,05$ | 8,40(7,80-12,60) $p_1 < 0,05$ | 1,64 (1,59-1,68) $p_1 < 0,05$ | 2,71 (2,69-2,74) $p_1 < 0,05$ |
| Клетки после действия SB203580 и NaHS (10мМ) | 5,10(4,90-5,80) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 16,20(15,00-21,50) $p_1 < 0,05$, $p_2 > 0,05$ | 2,08 (1,99-2,13) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 2,19 (2,13-2,24) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ |
| Клетки после действия NOC-5 (100 мкМ) | 8,70(8,50-8,80) $p_1 < 0,05$ | 80,70(76,20-84,30) $p_1 < 0,05$ | 1,62 (1,57-1,66) $p_1 < 0,05$ | 0,96 (0,91-1,01) $p_1 > 0,05$ |
| Клетки после действия SB203580 и NOC-5 (100 мкМ) | 0,60(0,30-0,80) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 89,90(88,00-92,30) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 0,80 (0,76-0,84) $p_1 > 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 0,38 (0,36-0,40) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ |
| Клетки после действия CORM-2 (50 мкМ) | 9,60(8,90-10,10) $p_1 < 0,05$ | 16,40(15,90-18,50) $p_1 < 0,05$ | 1,46 (1,20-1,31) $p_1 < 0,05$ | 1,67 (1,61-1,70) $p_1 < 0,05$ |
| Клетки после действия SB203580 и CORM-2 (50 мкМ) | 22,90(19,90-28,00) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 30,30(29,10-30,40) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 3,65 (3,59-3,70) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ | 3,25 (3,23-3,29) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$ |

Примечание: $p_1 < 0,05$ - по сравнению с интактными клетками линии Jurkat; $p_2 < 0,05$ - по сравнению с изолированным действием газа

Распределение клеток линии Jurkat по фазам клеточного цикла при ингибировании р38 MAPK-зависимых путей действия доноров газов, Me(Q1-Q3)

| Условия эксперимента | Количество клеток в G ₁ -фазе клеточного цикла, % | Количество клеток в S-фазе клеточного цикла, % | Количество клеток в G ₂ -фазе клеточного цикла, % |
|--|--|--|--|
| Интактные клетки | 55,53 (55,35-55,78) | 31,97 (31,57-32,19) | 14,41 (13,76-15,72) |
| Клетки после действия NOC-5 (100 мкМ) | 64,15 (63,17-65,94) p ₁ <0,05 | 19,81 (18,43-20,97) p ₁ <0,05 | 14,41 (13,75-15,21) p ₁ >0,05 |
| Клетки после действия SB203580 и NOC-5 (100 мкМ) | 61,57 (60,66-63,04) p ₁ <0,05 p ₂ >0,05 | 20,06 (17,86-23,34) p ₁ <0,05 p ₂ >0,05 | 16,90 (15,99-20,07) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 |
| Клетки после действия CORM-2 (50 мкМ) | 64,33 (62,27-68,66) p ₁ <0,05 | 15,39 (15,02-16,00) p ₁ <0,05 | 17,49 (15,00-19,34) p ₁ >0,05 |
| Клетки после действия SB203580 и CORM-2 (50 мкМ) | 59,93 (56,54-64,20) p ₁ <0,05 p ₂ >0,05 | 16,08 (12,23-21,99) p ₁ <0,05 p ₂ >0,05 | 21,47 (19,72-30,88) p ₁ <0,05 p ₂ >0,05 |
| Клетки после действия NaHS (50 мкМ) | 65,28 (63,96-67,42) p ₁ <0,05 | 18,53 (17,89-21,74) p ₁ <0,05 | 15,06 (14,35-16,70) p ₁ >0,05 |
| Клетки после действия SB203580 и NaHS (50 мкМ) | 63,28 (62,05-64,17) p ₁ <0,05 p ₂ >0,05 | 20,24 (19,15-21,32) p ₁ <0,05 p ₂ >0,05 | 16,02 (15,21-17,02) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 |
| Клетки после воздействия NaHS (10 мМ) | 63,12 (61,71-65,26) p ₁ <0,05 | 20,63 (19,04-22,90) p ₁ <0,05 | 15,87 (15,12-16,84) p ₁ >0,05 |
| Клетки после действия SB203580 и NaHS (10 мМ) | 65,27 (63,73-67,14) p ₁ <0,05 p ₂ >0,05 | 19,62 (17,86-21,41) p ₁ <0,05 p ₂ >0,05 | 16,52 (15,37-17,82) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 |

Примечание: p₁<0,05 – по сравнению с интактными клетками линии Jurkat; p₂<0,05 – по сравнению с изолированным действием донора газа

Процент клеток со сниженным Δψ после действия донора сульфида водорода в концентрации 10 мМ в 8 раз превышал таковой в контрольной группе (p<0,05). При воздействии на клетки линии Jurkat донора монооксида

углерода отмечалось 16-ти кратное увеличение числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом, по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (таблица 4).

Пермеабиллизация митохондриальных мембран при действии доноров газов может быть следствием как прямого повреждающего действия данных веществ на липиды митохондриальных мембран, так и происходить за счет изменения соотношения белков-регуляторов апоптоза семейства bcl-2.

Действие доноров оксида азота и сульфида водорода приводило к увеличению уровня Bcl-2 относительно контроля ($p < 0,05$). Bcl-2 способен гетеродимеризоваться с проапоптотическими членами семейства Bcl-2 и предотвращать их действие на митохондрии [Colitti M., 2012]. Донор монооксида углерода в концентрации 50 мкМ вызывал уменьшение содержания Bcl-2, по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Действие CORM-2 также приводило к снижению содержания другого антиапоптотического белка Bcl-X_L, по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре клеток линии Jurkat ($p < 0,05$). Bcl-X_L способен ингибировать апоптоз за счет образования неактивного тройного комплекса Bcl-X_L, Araf-1 и каспазы 9, вместо апоптосомы (комплекс цитохром c, Araf-1 и каспазы 9) [Bertini I. et al., 2011]. Содержание протеина Bcl-X_L при действии SNP, NaHS и NOC-5 не отличалось достоверно от соответствующего параметра в контроле ($p > 0,05$) (рисунок 4).

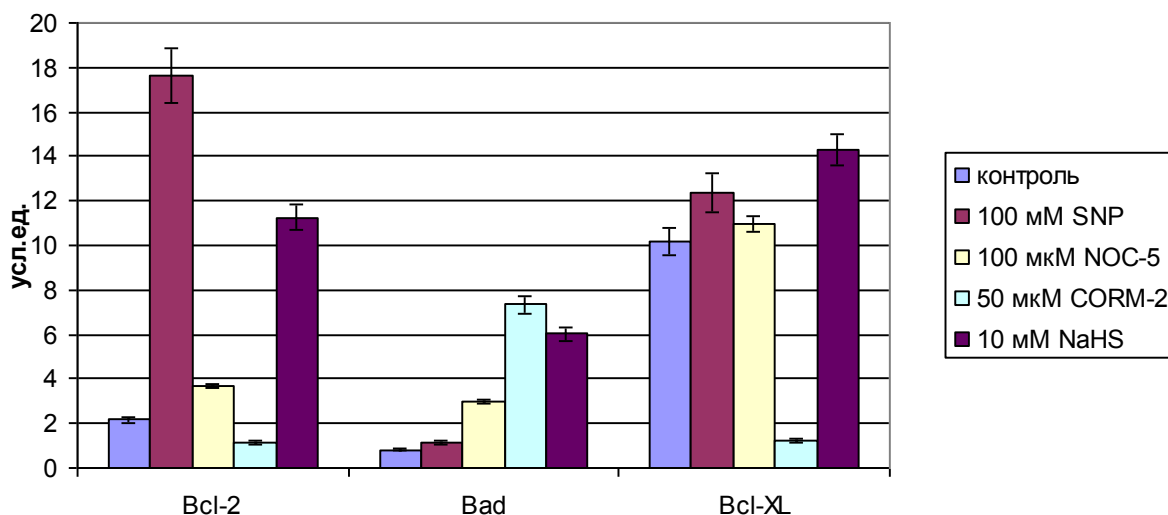


Рисунок 4 - Содержание белков семейства Bcl-2 в клетках линии Jurkat после действия доноров газовых транмиттеров, (Me(Q₁-Q₃))

Белок Bad относится к подклассу проапоптотических только-ВНЗ протеинов и способен с высокой аффинностью связываться с определенными антиапоптотическими молекулами и запускать программированную гибель [Narro L. et al., 2012]. Как показали результаты настоящего исследования, содержание проапоптотического белка Bad в интактных клетках линии Jurkat составило 0,83(0,66-0,92) усл.ед. Действие SNP в концентрации 100 мМ в течение 15 мин не приводило к изменениям содержания указанного протеина

относительно аналогичного параметра в контроле ($p > 0,05$). Содержание белка Bad возрастало при инкубации клеток с NOC-5, CORM-2 и NaHS, по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,05$) (рисунок 4).

Таким образом, повышение проницаемости митохондриальных мембран при действии на клетки линии Jurkat донора монооксида углерода опосредовано дисбалансом в системе белков семейства Bcl-2 (повышением содержания проапоптотического белка Bad и снижением содержания антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-X_L), наряду с повреждающим эффектом возросшего под влиянием донора монооксида углерода уровня АФК. Донор сульфида водорода способствует увеличению АФК продукции и проницаемости мембран митохондрий, возможно, за счет связывания с гем-содержащими белками митохондрий. Коллапс митохондриального трансмембранного потенциала при действии доноров оксида азота в различных концентрациях может быть обусловлен нитрозилированием митохондриальных белковых комплексов.

Нарушения регуляция активности каспаз 3 и 9 при действии доноров газотрансмиттеров на клетки линии Jurkat

Запуск апоптотической программы требует кооперации целого ряда молекул, включая сигнальные молекулы, рецепторы, ферменты и белки-регуляторы экспрессии генов. Среди них каскадная система каспаз, регулируемая белками-ингибиторами апоптоза (IAP), семейством белков Bcl-2 и кальпаином, является наиболее важной в реализации апоптоза [Launay S. et al., 2005].

В проведенном нами исследовании активность каспазы 3 в интактных клетках линии Jurkat была принята за единицу. Действие доноров газов приводило к достоверному повышению активности каспазы 3 по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (табл.4).

Нами была предпринята попытка оценить вклад TNF-опосредованного рецепторного пути апоптоза в индукцию каспазы 3 при действии доноров газовых трансммиттеров. Численность TNFR1-экспрессирующих клеток линии Jurkat после инкубации с SNP в концентрации 100 мМ была выше таковой в интактной культуре клеток линии Jurkat ($p < 0,05$). Инкубирование интактных клеток линии Jurkat с NOC-5 в концентрации 100 мкМ не вызывало достоверных изменений количества экспрессированных на поверхности клетки TNFR1, по сравнению с соответствующими значениями в контроле ($p > 0,05$). Донор сульфида водорода на экспрессию клетками линии Jurkat рецепторов к TNF α также не влиял ($p > 0,05$). Воздействие донора монооксида углерода приводило к 40-кратному повышению значений изучаемого параметра, по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (таблица 6).

Наличие на клеточной мембране рецепторов не позволяет судить о том, инициируется ли апоптоз по рецепторному пути или нет. Для ответа на этот вопрос нам представлялось целесообразным зафиксировать присутствие

соответствующего лиганда TNF α , запускающего внутриклеточный каскад, приводящий к активации каспаз.

В проведенных нами исследованиях анализ уровня продукции TNF- α в супернатантах клеточных культур клеток Т-лимфобластной лейкемии после действия доноров газов показал, что величина этого показателя *in vitro* при действии донора оксида азота SNP и сульфида водорода NaHS снижалась, по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Действие донора оксида азота NOC-5 и монооксида углерода CORM-2 на продукцию TNF- α влияния не оказывало ($p > 0,05$).

Таблица 6

Количество клеток, презентующих на своей поверхности TNFR1, и продукция TNF α клетками линии Jurkat после действия доноров газов, Me(Q1-Q3)

| Условия эксперимента | Экспрессия TNFR1, % | Продукция TNF α , пг/мл |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Интактные клетки | 2,00 (1,35-2,45) | 11,70 (10,8-12,4) |
| Клетки после действия SNP (100 мМ) | 17,93 (14,30-24,20) $p < 0,05$ | 4,20 (3,50-4,90) $p < 0,05$ |
| Клетки после действия NaHS (10 мМ) | 3,90 (2,30-4,95) $p > 0,05$ | 3,10 (1,80-4,30) $p < 0,05$ |
| Клетки после действия NOC-5 (100 мкМ) | 1,53 (1,35-1,75) $p > 0,05$ | 11,50 (11,20-11,80) $p > 0,05$ |
| Клетки после действия CORM-2 (50 мкМ) | 88,73 (85,10-93,45) $p < 0,05$ | 10,50 (10,10-10,90) $p > 0,05$ |

Примечание: $p < 0,05$ - по сравнению с интактными клетками линии Jurkat

Нами было продемонстрировано, что действие SNP (100 мМ), NaHS (10 мМ) и CORM-2 (50 мкМ) на клетки линии Jurkat приводит к возрастанию активности каспазы 9 относительно аналогичного параметра в интактных клетках ($p < 0,05$). Инкубация клеток Т-лимфобластной лейкемии с NOC-5 не приводила к активации каспазы 9, по сравнению с контролем ($p > 0,05$). Остановка апоптотической реакции на уровне функционирования каспаз может происходить за счет связывания последних с белками-ингибиторами каспазной активности (протеины семейства IAP, некоторые члены семейства Bcl-2). В настоящем исследовании была предпринята попытка оценить вклад белков-ингибиторов каспаз xIAP и Aven в молекулярные механизмы регуляции активности каспаз при действии доноров газов. Aven относится к антиапоптотическим белкам семейства Bcl-2. Он регулирует активность цистеиновых протеиназ, антиапоптотического протеина Bcl-X_L и Araf-1. Действие белка Aven связано с его способностью потенцировать антиапоптотическую активность Bcl-X_L и ингибировать проапоптотическое

действие Araf-1 [Chau B.N., 2000]. Показано, что протеин Aven уменьшает протеолитическую активацию каспаз и препятствует соединению каспазы-9 с Araf-1 [Melzer I.M. et al., 2012]. Оценка содержания данного протеина в клетках после действия доноров газов CORM-2 (50 мкМ), NaHS (10 мМ) и SNP (100 мМ) показала, что уровень Aven при указанных условиях относительно контроля не изменялся ($p > 0,05$). Нами было показано, что при действии донора NO в микромолярной концентрации в клетках возрастает содержание белка Aven относительно его уровня в интактной культуре клеток линии Jurkat ($p < 0,05$) (рисунок 5-7).

В рамках исследования оценивали содержание белка xIAP, способного к ингибированию активности каспазы-3. Данный протеин наиболее эффективно (среди других IAP-белков) ингибирует апоптоз, связываясь только с активными формами каспаз 3, 7 и 9, но не с их зимогенными проформами [Kim W.Y. et al., 2011]. xIAP также препятствует образованию апоптосомы с прокаспазой 9 и Araf-1 и предотвращает индукцию каспазы 3 [Cheung H.H. et al., 2006].

В проведенном нами исследовании установлено, что содержание xIAP после инкубации клеток Т-лимфобластной лейкемии с донором сульфида водорода достоверно не отличалось от аналогичного параметра в контроле ($p > 0,05$). Уровень xIAP снижался после действия донора CO на клетки линии Jurkat по сравнению с таковым в контроле ($p < 0,05$). Действие обоих используемых доноров оксида азота (100 мМ SNP и 100 мкМ NOC-5) приводило к повышению уровня xIAP ($p < 0,05$) (рисунок 5). Известно, что в результате действия оксида азота в клетках происходит нитрозилирование каспаз, что может сопровождаться ингибированием активности данных ферментов и торможением программированной гибели клеток. Рядом авторов было показано, что каспаза 9 является преимущественной мишенью данного ингибирующего нитрозилирования [Török N.J. et al., 2002; Maejima Y. et al., 2005]. В нашем исследовании впервые было продемонстрировано, что инактивация каспазы 9 при действии на клетки оксида азота также может происходить под влиянием белков-ингибиторов каспаз, уровень которых при действии донора NO повышается.

Таким образом, было установлено, что активация каспазы-3 при действии NO, CO и H₂S происходит за счет активации митохондриального пути апоптоза. При этом действие всех трех газов не приводит к эффективной индукции рецепторного пути. При действии NOC-5 в концентрации 100 мкМ активации каспазы 9 зарегистрировано не было, что могло быть обусловлено возросшим под влиянием NO уровнем белков xIAP и Aven.

Нарушения регуляции продолжительности G₁-фазы клеточного цикла клеток линии Jurkat при действии доноров газов

G₁-фаза является критическим периодом клеточного цикла, когда позитивные и негативные сигналы могут вмешиваться в его регуляцию. На молекулярном уровне циклин-D-зависимые киназы являются интеграторами внеклеточных сигналов. Переход из G₁- в S- фазу происходит под влиянием

циклинов, экспрессия которых увеличивается в ответ на митогенный сигнал. Циклины D1, D2 и D3 связываются с циклин-зависимыми киназами Cdk4, Cdk6 и Cdk2 в течение G₁-фазы, что приводит к фосфорилированию белка ретинобластомы Rb. Данное событие является критическим в прогрессии клеточного цикла, так как приводит к инициации транскрипции ряда генов, ответственных за прогрессию S-фазы [Neganova I., Lako M. 2008].

Действие доноров всех трех изучаемых газов не влияло на содержание Cdk4 в клетках линии Jurkat ($p > 0,05$). Нами было показано, что действие донора сульфида водорода NaHS в концентрации 50 мкМ снижает содержание белка циклина D1 относительно такового в интактной культуре клеток линии Jurkat ($p < 0,05$). Действие доноров оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода (10 мМ) вызывали увеличение уровня циклина D1, по сравнению с таковым в интактных клетках ($p < 0,05$). Активность комплексов циклин/циклин-зависимая киназа может быть инактивирована протеинами, названными Cdk-ингибиторами (CKI), которые связываются с Cdk или с комплексами циклин-cdk. К данным белкам относится протеин p21 (Waf1, Cip1), способный ингибировать комплекс Cdk-циклин G₁-фазы, а также синтез ДНК за счет связывания и инактивации ядерного антигена (PCNA) пролиферирующих клеток [Sherr CM, Roberts JM., 2004]. Содержание p21 не изменялось после инкубации клеток линии Jurkat с NOC-5 в концентрации 100 мкМ, CORM-2 в концентрации 50 мкМ и NaHS в обеих концентрациях (50 мкМ и 10 мМ) ($p > 0,05$). Для оценки эффективности действия комплекса Cdk4/6-циклин D1 нами было проанализировано содержание в клетках фосфорилированной формы протеина продукта гена супрессора опухолей Rb. Данный белок представляет собой ядерный фосфопротеин, который репрессирует транскрипцию генов, ответственных за переход G₁-S фаз, и индуцирует арест клеток в G₁-фазе [Giacinti C., Giordano A., 2006]. В нашей лаборатории было установлено, что содержание pRb в клетках Т-лимфобластной лейкемии после инкубации с NaHS в концентрации 50 мкМ было ниже его уровня в контроле ($p < 0,05$). Следовательно, действие донора сульфида водорода в данной концентрации вызывает остановку клеток в G₁-фазе клеточного цикла за счет уменьшения фосфорилирования белка ретинобластомы, опосредованного снижением уровня циклина D1 при действии указанного газа. Кроме того, было показано, что инкубация клеток линии Jurkat с донорами оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода в концентрации 10 мМ приводит к возрастанию содержания фосфорилированного Rb, по сравнению с уровнем его в интактной культуре ($p < 0,05$) (таблица 7).

Таким образом, торможение G₁-фазы клеточного цикла клеток Т-лимфобластной лейкемии при действии NOC-5 в концентрации 100 мкМ, CORM-2 в концентрации 50 мкМ и сульфида водорода в концентрации 10 мМ, по всей видимости, не специфично и не обусловлено сигнальными свойствами данных молекул. Более того, действие газов в качестве вторичных мессенджеров обуславливает повышение содержания белков, способствующих прогрессии клеточного цикла (циклин D1, pRb). Действие донора сульфида водорода в концентрации 50 мкМ привело к изменениям соотношения белков-

регуляторов клеточного цикла, приводящим к задержке клеток в G₁-фазе. Таким образом, донор сульфида водорода способен оказывать дозозависимый эффект на ключевые молекулы, ответственные за прогрессию G₁-фазы клеточного цикла Jurkat клеток. Данное свойство нуждается в дальнейшем изучении с целью применения доноров сульфида водорода в качестве антипролиферативных агентов.

Таблица 7

Содержание белков-регуляторов клеточного цикла в клетках линии Jurkat после действия доноров газов, Me(Q1-Q3)

| Условия эксперимента | Содержание p21, усл.ед | Содержание pRB, усл.ед. | Содержание Cdk4, усл.ед. | Содержание циклина D1, усл.ед. |
|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| Интактные клетки | 17,77 (13,92-20,96) | 9,83 (9,22-14,96) | 8,06 (7,65-8,38) | 9,83 (8,74-15,58) |
| Клетки после действия NOC-5 (100 мкМ) | 13,96 (12,53-15,38) p>0,05 | 36,87 (30,92-42,80) p<0,05 | 7,43 (7,02-8,14) p>0,05 | 113,47 (91,43-117,28) p<0,05 |
| Клетки после действия CORM-2 (50 мкМ) | 18,86 (17,48-28,45) p>0,05 | 22,78 (21,45-32,02) p<0,05 | 8,18 (7,82-8,54) p>0,05 | 22,45 (21,89-34,22) p<0,05 |
| Клетки после действия NaHS (10 мМ) | 14,82 (13,90-15,76) p>0,05 | 24,16 (23,05-25,11) p<0,05 | 7,84 (7,52-8,19) p>0,05 | 31,09 (27,84-36,48) p<0,05 |
| Клетки после действия NaHS (50 мкМ) | 12,32 (12,00-13,31) p>0,05 | 7,32 (6,90-8,25) p<0,05 | 8,31 (8,0-8,59) p>0,05 | 0,72 (0,63-0,74) p<0,05 |

Примечание: p<0,05- по сравнению с интактными клетками линии Jurkat

Механизмы изменения содержания ключевых белков-регуляторов апоптоза и клеточного цикла при действии на клетки линии Jurkat доноров газов

Запуск важнейших внутриклеточных процессов, к числу которых относятся апоптоз, пролиферация и синтез цитокинов, определяется в конечном итоге изменением белок-белковых взаимодействий. Количественное соотношение внутриклеточных протеинов, их транскрипционная и ферментативная активность зависят от экспрессии соответствующих генов, посттранскрипционной и посттрансляционной модификации образующихся белковых продуктов. Для установления молекулярных механизмов, лежащих в основе изменения содержания белков-регуляторов апоптоза и клеточного цикла при действии доноров газовых трансмиттеров, был проведен РТ-ПЦР анализ экспрессии мРНК генов, кодирующих изучаемые протеины. Нами был изучен также вклад p38 MAPK-опосредованного фосфорилирования в изменение соотношения протеинов, участвующих в регуляции программированной гибели клеток и прогрессии фаз клеточного цикла.

Необходимо отметить, что действие SNP в концентрации 100 мМ сопровождалось снижением экспрессии генов bcl-2, bcl-XL, xiap, aven, циклин

D1 относительно контрольных значений ($p < 0,05$). Инкубирование клеток линии Jurkat с SNP в концентрации 100 мМ приводило к возрастанию уровня мРНК p21 и bax, по сравнению с аналогичными параметрами в интактных клетках ($p < 0,05$). В результате проведенных нами исследований не было выявлено изменений уровня экспрессии гена bad относительно такового в контрольной культуре ($p > 0,05$) (таблица 3).

Инкубация клеток линии Jurkat с донором сульфида водорода в концентрации 10 мМ привела к снижению уровня экспрессии мРНК генов bcl-2, bcl-X_L, xiap, авен, циклин D1 относительно контроля ($p < 0,05$). Вместе с тем, содержание мРНК гена p21 при действии на клетки линии Jurkat NaHS в концентрации 10 мМ увеличивалось по сравнению с таковым в интактных клетках ($p < 0,05$). Экспрессия мРНК гена bad после инкубации клеток Т-лимфобластной лейкемии с донором сульфида водорода в концентрации 10 мМ относительно контрольных значений не изменялась ($p > 0,05$) (таблица 3).

Действие на клетки Т-лимфобластной лейкемии NOC-5 в концентрации 100 мкМ приводило к резкому (тринадцатикратному) повышению экспрессии гена bad, а также к возрастанию уровня экспрессии p21, по сравнению с соответствующими значениями в интактных клетках линии Jurkat ($p < 0,05$). Уровень экспрессии мРНК гена авен оставался на таковом в контроле при действии на клетки Т-лимфобластной лейкемии NOC-5 ($p > 0,05$). При этом инкубация клеток линии Jurkat с NOC-5 в концентрации 100 мкМ сопровождалась снижением уровня экспрессии генов bcl-2, bcl-X_L, xiap, циклин D1 относительно контроля ($p < 0,05$) (таблица 3).

Донор монооксида углерода CORM-2, действуя в концентрации 50 мкМ, являлся причиной снижения экспрессии генов bcl-X_L, xiap, циклин D1 ($p < 0,05$). Уровень экспрессии p21 при инкубации клеток с CORM-2 достоверно превышал таковой в контрольной группе ($p < 0,05$). Действие на клетки CORM-2 не вызывало изменений в экспрессии генов bcl-2 и авен относительно интактных клеток ($p > 0,05$) (таблица 3).

Полученные в результате проведенного нами исследования данные о внутриклеточном содержании белков-регуляторов апоптоза и клеточного цикла свидетельствуют о том, что снижение экспрессии генов не приводило к снижению содержания соответствующих протеинов, за исключением белка p21, содержание которого не изменялось, несмотря на повышение экспрессии соответствующего гена (таблица 3, рисунок 5-7).

На примере белка Bcl-2 было показано, что S-нитрозилирование данного протеина предотвращает его деградацию через убиквитин-протеасомальный путь [Azad N. et al., 2006]. Действие доноров оксида азота в обеих использованных нами концентрациях приводило к увеличению содержания белков xiAP и Bcl-2 относительно контрольных значений. Можно предположить, что нарушение деградации указанных протеинов обязано именно реакции нитрозилирования. S-нитрозилирование является широко распространенной окислительной модификацией тиоловых групп цистеина оксидом азота, опосредуя тем самым сигнальные свойства данной молекулы.

В проведенном нами исследовании было установлено, что при действии на клетки донора монооксида углерода происходит достоверное увеличение уровня белков Bad и циклина D1 относительно соответствующих значений в интактных клетках линии Jurkat ($p < 0,05$). Увеличение внутриклеточного уровня белка при пониженной экспрессии соответствующего гена может происходить при его высвобождении из связи с протеинами-ингибиторами или из внутриклеточных депо. Возможно, именно за счет этих механизмов происходит повышение содержания белков Bad и циклина D1 при инкубации клеток с CORM-2.

Инкубация клеток с NaHS в концентрации 10 мМ приводила к увеличению содержания белков Bcl-2, Bad и циклина D1 относительно контрольных значений. Возможно, повышение содержания данных протеинов также опосредовано замедлением их деградации. Однако в случае сульфида водорода причиной ингибирования разрушения белков может являться реакция сульфгидрирования. В исследованиях *in vitro* было показано, что данная реакция может происходить только в присутствии окислительного эквивалента, иными словами только в условиях повышения внутриклеточного количества прооксидантов [Jacob C. et al., 2008; Kabil O., Banerjee R., 2010].

Для выяснения молекулярных механизмов, лежащих в основе изменения содержания протеинов, мы определили содержание исследуемых белков в клетках с ингибированной p38 MAPK и подвергаемых в дальнейшем инкубации с донорами газовых трансммиттеров. Нами были получены результаты, свидетельствующие о том, что повышение содержания белков Bcl-2 и XIAP при действии на клетки SNP зависит от фосфорилирования данных протеинов p38 MAPK. При этом p38 MAPK, являлась негативным регулятором содержания Bad и Bcl-X_L при действии на клетки донора оксида азота. p38 MAPK не влияла на SNP-опосредованное угнетение экспрессии генов (таблица 3, рисунок 5).

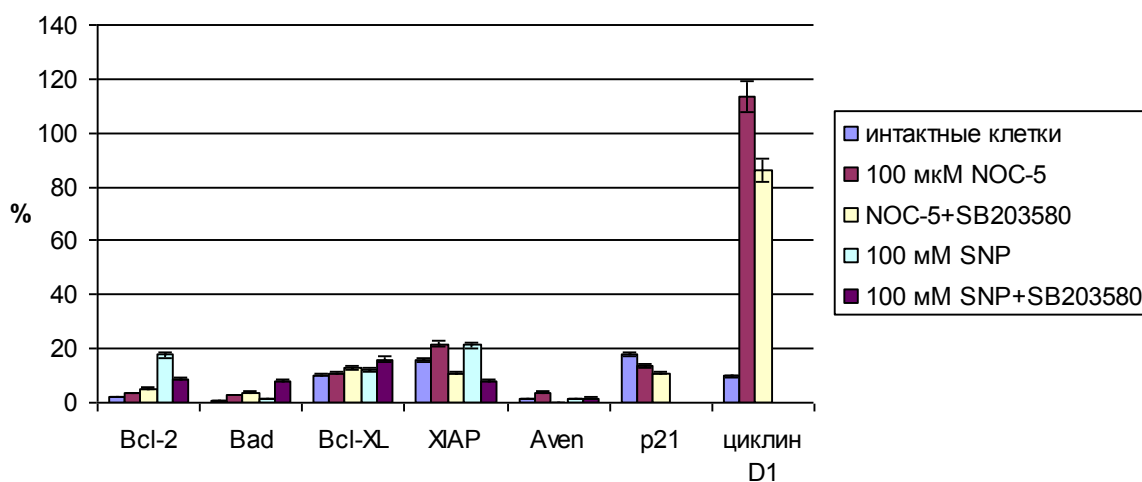


Рисунок 5 - Содержание белков-регуляторов апоптоза и клеточного цикла при выключении p38 MAPK-зависимых механизмов действия доноров оксида азота, (Me(Q₁-Q₃))

Показатели экспрессии генов *bcl-2*, *bad*, *bcl-X_L*, *xiap*, *aven* в NOC-5+p38 MAPK-обработанных Jurkat клетках относительно соответствующих значений в NOC-5-обработанной культуре не изменялись ($p>0,05$). Ингибирование p38 MAPK не отражалось на содержании белков *Bad* и *Bcl-X_L* в условиях действия на клетки Т-лимфобластной лейкемии донора оксида азота в концентрации 100 мкМ ($p>0,05$). При этом уровни протеинов *xIAP* и *Aven*, повышенные относительно контроля при изолированном действии NOC-5, снижались при ингибировании p38-MAPK зависимых путей действия газа ($p<0,05$). Следовательно, посттрансляционная модификация, лежащая в основе увеличения уровня *xIAP* и *Aven*, требует как минимум двух факторов – повышенного содержания оксида азота и функционирующей p38 MAPK (табл.3, рисунок 5).

Изучение роли p38 MAPK в СО-опосредованном изменении содержания белков-регуляторов апоптоза показало, что сочетанное воздействие SB 203580 и CORM-2 на клетки Т-лимфобластной лейкемии приводило к повышению уровня всех изучаемых белков, за исключением *Aven*. Для выяснения причины повышения содержания большинства изучаемых протеинов мы обратились к результатам, полученным при изучении экспрессии генов после ингибирования p38 MAPK-зависимых путей действия СО. Было показано, что повышение экспрессии генов лежит в основе увеличения содержания протеинов в случае ингибирования p38 MAPK-зависимых путей действия СО. При этом снижение экспрессии генов при действии СО опосредовано активацией p38 MAPK (таблица 3, рисунок 6).

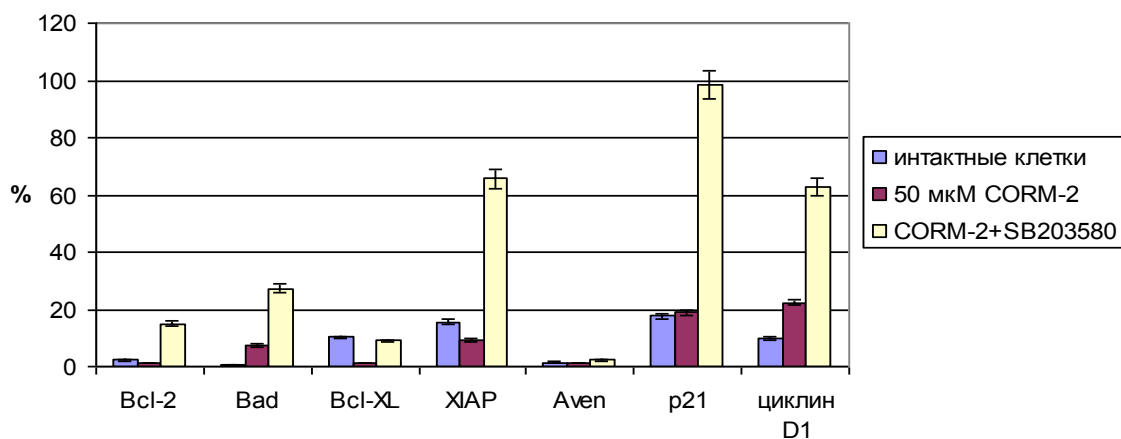


Рисунок 6 - Содержание белков-регуляторов апоптоза и клеточного цикла при выключении p38 MAPK-зависимых механизмов действия донора монооксида углерода, (Me(Q₁-Q₃))

P38 MAPK играла ключевую роль в изменении содержания белка *Bcl-2* при действии на клетки донора сульфида водорода. Воздействие ингибитора p38 MAPK не изменяло экспрессию генов *bcl-2*, *xiap* и *aven*, по сравнению с соответствующими значениями в клетках с действующей p38 MAPK в условиях повышения внутриклеточной концентрации сульфида водорода ($p>0,05$). Уровень экспрессии генов *bad* снижался, а уровень *bcl-X_L* поднимался в

NaHS+SB203580-обработанных клетках, относительно аналогичных параметров в клетках после действия донора газа ($p < 0,05$). При этом ингибирование p38 MAPK приводило к снижению содержания Bad усл.ед. относительно такового в NaHS-обработанных клетках ($p < 0,05$). P38 MAPK не участвовала в регуляции содержания белка Bcl-X_L, о чем свидетельствовал неизменный уровень данного протеина относительно аналогичных параметров в клетках, обработанных только донором газа ($p > 0,05$). Уровень протеина Aven возрастал в NaHS+SB203580-обработанных клетках, по сравнению с таковым при действии донора H₂S ($p < 0,05$). Содержание другого белка-ингибитора каспаз XIAP после ингибирования p38 MAPK-зависимых сигнальных путей действия донора сульфида водорода не изменялось ($p > 0,05$) (таблица 3, рисунок 7).

Ингибирование p38 MAPK-зависимых путей сигнальной трансдукции не приводило к изменению содержания белков-регуляторов клеточного цикла при действии на клетки донора оксида азота относительно аналогичного параметра при изолированном действии донора газа (рисунок 5).

Содержание белков циклина D1 и p21 возрастало при ингибировании p38 MAPK-зависимых путей действия донора монооксида углерода по сравнению с таковыми при изолированном действии газа ($p < 0,05$). Очевидно, p38 MAPK является негативным регулятором уровня белков, участвующих в прогрессии фаз клеточного цикла (рисунок 6).

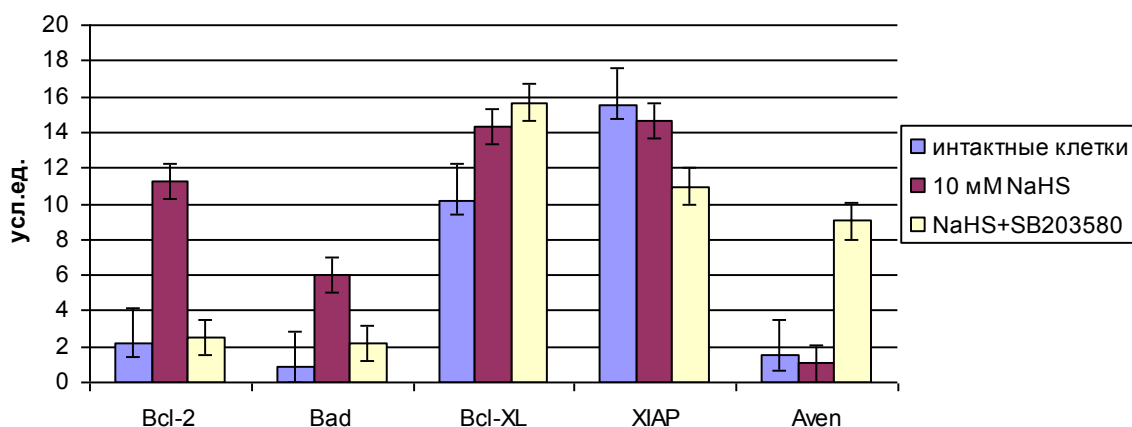


Рисунок 7 - Содержание белков-регуляторов апоптоза и клеточного цикла при выключении p38 MAPK-зависимых механизмов действия донора сульфида водорода, (Me(Q₁-Q₃))

Выключение p38 MAPK-зависимых путей передачи внутриклеточного сигнала при действии на клетки сульфида водорода в концентрации 50 мкМ не приводило к изменению уровней циклина D1 и p21 относительно таковых в культуре клеток после изолированного действия газа ($p > 0,05$).

Таким образом, увеличение содержания белков при действии на клетки доноров газов оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода обусловлено p38 MAPK-зависимой посттрансляционной модификацией протеинов и не зависит от экспрессии генов. P38 митоген-активируемая киназа

является негативным регулятором экспрессии генов и, следовательно, содержания белков при действии на клетки линии Jurkat донора монооксида углерода.

Молекулярные мишени действия p38 MAPK в опосредованной газами дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток

Снижение числа апоптотически-измененных клеток при выключении p38 MAPK-зависимых сигнальных каскадов свидетельствовало о том, что сульфид водорода передает сигнал к апоптозу посредством p38 MAP киназы. Нами были получены результаты, показывающие, что ингибирование p38 MAPK приводит к повышению активности каспазы 3 относительно соответствующих значений при изолированном действии газа ($p < 0,05$). p38 MAPK-зависимой мишенью действия донора сульфида водорода, нарушение содержания которой приводит к модуляции апоптоза клеток линии Jurkat, является белок Bcl-2. Изменения других тестируемых нами показателей при ингибировании p38 MAPK (снижение Bad, повышение Aven), по всей видимости, не вносят вклад в проапоптотическое действие сульфида водорода (таблица 4, рисунок 7).

Действие CORM-2 на фоне ингибированной p38 MAPK приводило к увеличению апоптоза клеток линии Jurkat. Величины активности каспаз 3 и 9, число клеток со сниженным митохондриальным потенциалом увеличивались при действии на клетки линии Jurkat ингибитора p38 MAPK и донора CO относительно соответствующих значений при изолированном действии газа ($p < 0,05$). В случае Bcl-2 и Bcl-X_L p38 MAPK проявляла проапоптотические свойства, являясь негативным регулятором содержания данных антиапоптотических белков. Антиапоптотический потенциал p38 киназы, отчасти, может быть обусловлен негативной регуляцией содержания белка Bad при действии донора CO. Возможно, повышение содержания Bad нивелировало увеличение уровня Bcl-2 и Bcl-X_L, что в целом приводило к интенсификации апоптоза при ингибировании p38 MAPK и действии донора монооксида углерода (таблица 4, рисунок 6).

В случае действия донора оксида азота в высокой и низкой дозах на клетки линии Jurkat p38 MAPK обладала проапоптотическим действием. При этом действие SNP на фоне ингибированной p38 MAPK приводило к снижению активности каспаз 3 и 9 ($p < 0,05$). Белок семейства Bcl-2 Aven, обладающий способностью ингибировать каспазу 3, не является p38 MAPK-зависимой мишенью действия оксида азота. Уровень протеина xIAP был достоверно ниже в клетках при ингибировании p38 MAPK, по сравнению с таковыми, содержащими активную форму данной киназы в условиях действия на клетки SNP в концентрации 100 мМ (таблица 4, рисунок 5).

P38 MAP киназа стабилизировала мембраны митохондрий при действии на клетки NOC-5 в концентрации 100 мкм. При этом ингибирование p38 MAPK приводило к повышению содержания антиапоптотического белка Bcl-2. Необходимо отметить, что повышение проницаемости митохондриальных мембран при действии на клетки линии Jurkat NOC-5 не приводило к активации

каспаз 3 и 9, напротив, отмечалось угнетение активности данных ферментов. При этом отмечалось снижение уровня белков xIAP и Aven, способных к ингибированию активности каспаз 3 и 9 (таблица 4, рисунок 5).

p38 MAPK-зависимыми мишенями действия всех трех газов являлся белок Bcl-2. При этом ингибирование p38 киназы при действии CO и NO в низких концентрациях вызывало увеличение содержания протеина Bcl-2, суммируясь в интенсификацию апоптоза при увеличении внутриклеточной концентрации монооксида углерода и в его снижение при действии оксида азота. Ингибирование p38 MAPK при действии сульфида водорода приводило к снижению уровня Bcl-2 и Bad. p38 MAPK-зависимыми также являлись белок Aven при увеличении внутриклеточной концентрации H₂S и протеин Bcl-X_L - при действии CO. В обоих случаях p38 киназа была негативным регулятором данных протеинов и, нивелируя опосредованное газами повышение содержания Aven и Bcl-X_L, способствовала проапоптотическому действию газов.

Таким образом, p38 MAPK обладает проапоптотическим действием при инкубации клеток линии Jurkat с донорами оксида азота и сульфида водорода, а также антиапоптотическим - в случае действия донора монооксида углерода.

Заключение

Описанию молекулярных механизмов участия оксида азота в жизнедеятельности клеток, эффектам его действия и молекулярным мишеням уделяется в настоящее время внимание многих исследователей. На основе этого разработаны и широко применяются лекарственные средства, содержащие NO в качестве основного действующего агента. Монооксид углерода и сульфид водорода в качестве сигнальных молекул получили признание сравнительно недавно. Однако уже выявлены специфические молекулярные механизмы действия данных веществ, описаны их основные эффекты на различных уровнях (органном, тканевом, клеточном). На разных стадиях клинических испытаний находятся лекарственные средства, высвобождающие CO и H₂S.

В исследовании показано, что дозозависимое действие доноров газотрансмиттеров в отношении апоптоза определяется типом исследуемых клеток. «Здоровые» клетки (в настоящем диссертационном исследовании – мононуклеарные лейкоциты, характеризующиеся сбалансированным уровнем регуляторных молекул) не вступали на путь запрограммированной гибели под действием газов. Дизрегуляция апоптотической программы на уровне белков семейства Bcl-2 и белков-ингибиторов каспаз способствовала селективной гибели опухолевых клеток линии Jurkat при действии доноров газов.

Как показали полученные фактические данные, доноры газов запускают апоптоз опухолевых клеток за счет действия на различные регуляторные молекулы и механизмы. При этом действие доноров NO (SNP и NOC-5) *in vitro* характеризуется резким падением митохондриального трансмембранного потенциала. Апоптотические изменения при действии доноров NO сопровождаются активацией каспазы 3 в клетках линии Jurkat. Однако каспаза 9 остается неактивной в клетках Т-лимфобластной лейкемии, несмотря на

значительные изменения митохондриальной проницаемости. Одной из возможных причин отсутствия активности каспазы 9 является повышение содержания антиапоптотических белков-ингибиторов каспазной активности xIAP и Aven при действии NO.

Донор монооксида углерода обладает проапоптотическим действием в отношении опухолевых клеток линии Jurkat. Просуицидальный эффект в случае CO достигается благодаря дисбалансу белков семейства Bcl-2 (снижение содержания антиапоптотических протеинов и повышение уровня проапоптотических членов данного семейства); падению митохондриального трансмембранного потенциала; активации каспаз 9 и 3.

Проапоптотическое действие донора сульфида водорода реализуется за счет снижения митохондриального трансмембранного потенциала с последующей активацией каспаз 3 и 9. При действии на опухолевые клетки донора сульфида водорода дисбаланс в системе белков семейства Bcl-2 характеризуется повышением содержания как про-, так и антиапоптотических представителей данного семейства.

Необходимо отметить, что газотрансмиттеры участвуют в регуляции апоптоза в концентрациях, превышающих таковые для передачи вазодилаторного импульса. Нами была показана эффективная активация редокс-зависимых сигнальных путей в Jurkat клетках при действии доноров всех трех газов. Данный факт указывает на вовлеченность активных форм кислорода в регуляторное действие газов.

Изменения внутриклеточного содержания регуляторных протеинов сопряжены с активностью редокс-зависимой p38 MAPK. Нами было установлено, что функция данной киназы варьирует от про- до антиапоптотической в зависимости от применяемого для индукции апоптоза газотрансмиттера. В проведенном исследовании была продемонстрирована атипичная антиапоптотическая роль p38 MAPK в условиях действия на клетки донора монооксида углерода. При этом именно активация p38 MAPK приводила к супрессии изучаемых генов при действии CO.

Замедление прогрессии клеточного цикла при действии CO, NO и H₂S в высокой концентрации происходит на фоне повышения содержания белков, промотирующих клеточный цикл без адекватной активации последнего. Остановка клеток в G₁-фазе при действии донора сульфида водорода в низкой концентрации является следствием снижения содержания циклина D1 и фосфорилированной формы Rb.

Таким образом, проапоптотическое и антипролиферативное действие доноров всех трех газотрансмиттеров (NO, CO и H₂S) требует вовлеченности активных форм кислорода. Определено участие p38 MAPK в опосредуемых газами молекулярных механизмах. При этом действие каждого газотрансмиттера характеризуется индивидуальным спектром вовлеченных регуляторных молекул (рисунок 8-10). Дальнейшие исследования должны быть направлены на выявление роли данных механизмов при различных физиологических и патологических состояниях.

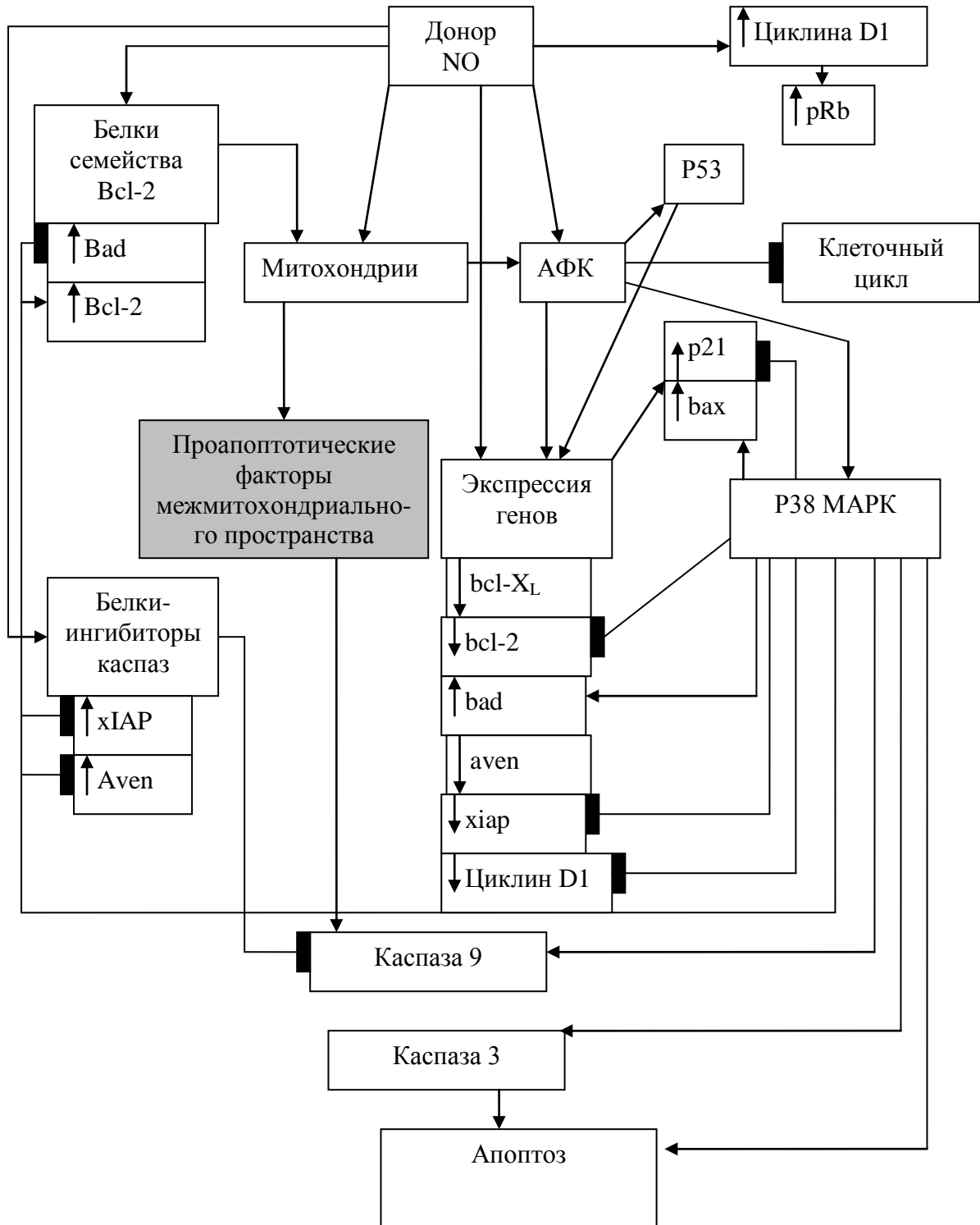


Рисунок 8 - Молекулярные механизмы действия оксида азота в дизрегуляции апоптоза и клеточного цикла опухолевых клеток линии Jurkat (по данным S. Elmore (2007) (выделено цветом) и результатам собственных исследований)

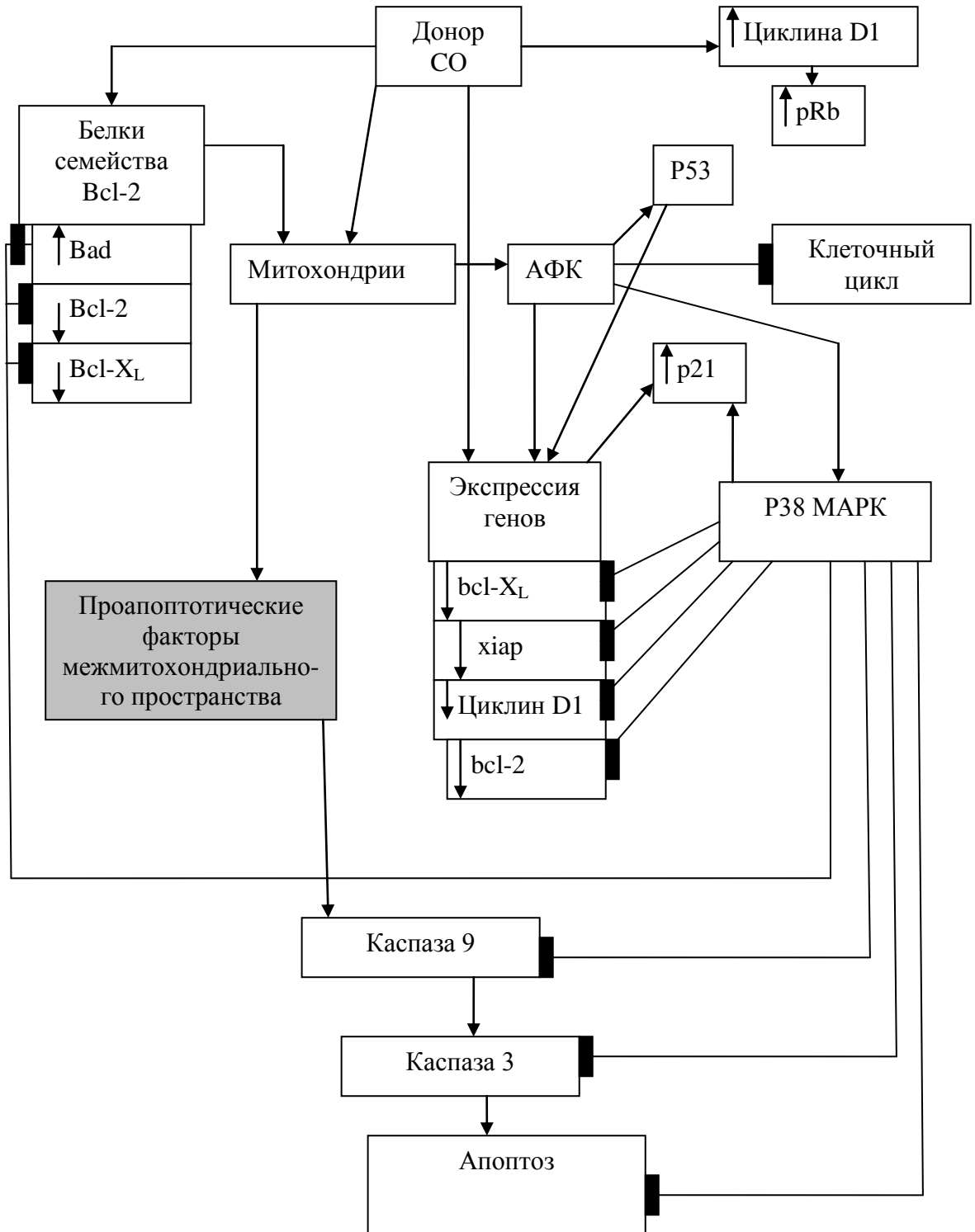


Рисунок 9 - Молекулярные механизмы действия монооксида углерода в дизрегуляции апоптоза и клеточного цикла опухолевых клеток линии Jurkat (по данным S. Elmore (2007) (выделено цветом) и результатам собственных исследований)

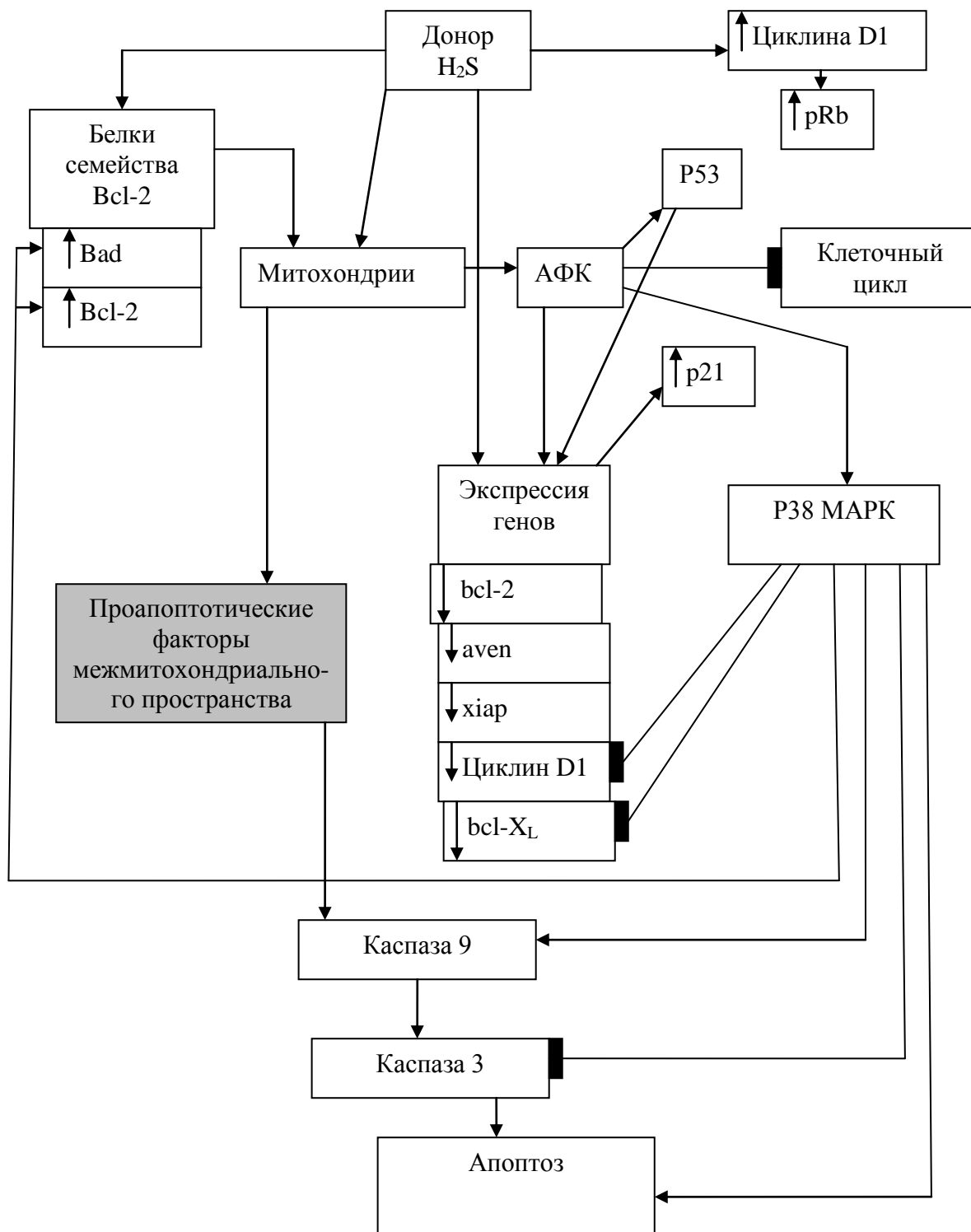


Рисунок 10 - Молекулярные механизмы действия сульфида водорода в дизрегуляции апоптоза и клеточного цикла опухолевых клеток линии Jurkat (по данным S. Elmore (2007) (выделено цветом) и результатам собственных исследований).

Выводы

1. Инкубация клеток линии Jurkat с донорами газовых транскмиттеров (SNP, NOC-5, NaHS и CORM-2) сопровождается дозозависимым, избирательным проапоптотическим (SNP в дозе 100 мМ и NaHS в дозе 10 мМ при действии в течение 15 мин, NOC-5 в концентрации 100 мкМ и CORM-2 в концентрации 50 мкМ при воздействии в течение 24 ч) эффектом *in vitro* в отношении опухолевых клеток линии Jurkat; действие указанных веществ (100 мМ SNP, 100 мкМ NOC-5, 10 мМ NaHS, 50 мкМ CORM-2) не приводит к изменению реализации апоптоза мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров. Антипролиферативный эффект доноров газовых транскмиттеров (100 мкМ NOC-5, 10 мМ NaHS, 50 мкМ CORM-2, 50 мкМ NaHS) выражается в увеличении числа клеток линии Jurkat в G₁-фазе клеточного цикла.
2. Инкубация клеток линии Jurkat с донорами газовых транскмиттеров в проапоптотических концентрациях (100 мМ SNP, 100 мкМ NOC-5, 10 мМ NaHS, 50 мкМ CORM-2) приводит к повышению внутриклеточной продукции АФК и вызывает в клетках активацию редокс-зависимых сигнальных молекул (белок p53, экспрессия мРНК генов bax и p21). Действие NaHS в концентрации 50 мкМ не сопровождается индукцией окислительных изменений.
3. Снижение митохондриального трансмембранного потенциала в опухолевых клетках линии Jurkat при действии доноров оксида азота (10 мМ SNP и 100 мкМ NOC-5) и сульфида водорода (10 мМ NaHS) происходит на фоне повышения содержания как про-, так и антиапоптотических протеинов семейства Bcl-2 (повышение содержания Bcl-2 и Bad). Запуск митохондриального пути апоптоза при действии на опухолевые клетки линии Jurkat донора монооксида углерода в концентрации 50 мкМ опосредован дисбалансом белков семейства Bcl-2 (повышение содержания проапоптотического протеина Bad и снижения уровня Bcl-2 и Bcl-X_L).
4. Изменение содержания белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2 при действии донора монооксида углерода (50 мкМ CORM-2) происходит на фоне уменьшения экспрессии мРНК генов bcl-X_L и bad. Инкубация клеток линии Jurkat с донором оксида азота (10 мМ SNP) приводит к повышению содержания протеина Bcl-2 на фоне снижения экспрессии мРНК соответствующего гена. Увеличение содержания белка Bad при действии на клетки линии Jurkat донора оксида азота (100 мкМ NOC-5) связано с повышением экспрессии мРНК гена bad. Действие донора сульфида водорода в концентрации 10 мМ сопровождается увеличением содержания протеинов Bad и Bcl-2 при снижении экспрессии мРНК гена bcl-2 и отсутствии изменений экспрессии мРНК гена bad в клетках линии Jurkat *in vitro*.
5. Отсутствие активации каспазы 9 при действии донора оксида азота (100 мкМ NOC-5) на фоне запуска митохондриального пути сопряжено с аккумуляцией белков-ингибиторов каспаз XIAP и Aven в клетках линии Jurkat. Инкубация клеток линии Jurkat с донорами сульфида водорода (10

- мМ NaHS) и монооксида углерода (50 мкМ CORM-2) *in vitro* не сопровождается повышением содержания χ IAP и Aven в клетках.
6. Увеличение числа клеток линии Jurkat в G₁-фазе клеточного цикла при действии доноров газовых трансмиттеров в проапоптотических дозах (100 мкМ NOC-5, 10 мМ NaHS, 50 мкМ CORM-2) реализуется на фоне повышения содержания белков-промоторов клеточного цикла (циклин D1, pRb).
 7. Увеличение числа клеток линии Jurkat в G₁-фазе клеточного цикла при действии донора сульфида водорода (50 мкМ NaHS) обусловлено снижением экспрессии мРНК гена циклина D1, содержания соответствующего белка и фосфорилированной формы белка pRb.
 8. При действии доноров оксида азота (100 мМ SNP и 100 мкМ NOC-5) и сульфида водорода (10 мМ NaHS) на опухолевые клетки линии Jurkat *in vitro* p38 MAPK оказывает проапоптотический эффект; при инкубации клеток линии Jurkat с донором монооксида углерода (50 мкМ CORM-2) - антиапоптотический. При этом мишенями p38 MAPK являются как про-, так и антиапоптотические молекулы (Bad, Bcl-2, χ IAP, Aven, каспаза 3 и 9 при действии доноров оксида азота; Bad, Bcl-2, Bcl-X_L, χ IAP, каспаза 3 и 9 - донора монооксида углерода; Bad, Bcl-2, Aven, каспаза 3 и 9 - донора сульфида водорода). p38 MAP киназа не участвует в опосредованной донорами газов (100 мкМ NOC-5, 10 мМ NaHS, 50 мкМ CORM-2, 50 мкМ NaHS) регуляции клеточного цикла клеток линии Jurkat *in vitro*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. The role of transcriptional factors P53 and NF-KB in the induction of apoptosis during the oxidative stress *in vitro* / L.A. Kleptsova (L.A. Tashireva), I.S. Losenkov, E.G. Starikova, E.V. Kaigorodova, M.V. Belkina // Материалы V международной (XIV всероссийской) пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, Москва, РГМУ, 2010. – Москва, 2010. – с. 436
2. Molecular mechanisms of the oxidative stress effect on BCL-2 family proteins / I.S. Losenkov, L.A. Kleptsova (L.A. Tashireva), E.G. Starikova, E.V. Kaigorodova, A.N. Maroshkina // Материалы V международной (XIV всероссийской) пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, Москва, РГМУ, 2010. – Москва, 2010. – с. 437
3. Изменения реализации апоптотической программы трансформированных клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров при воздействии сульфида водорода / Л.А. Клепцова (Л.А. Таширева), Е.Г. Старикова, Ю.В. Стариков, Е.В. Кайгородова // Сибирский онкологический журнал. – 2010. Приложение № 1. – с. 58-59.
4. Влияние сульфида водорода на реализацию апоптотической программы опухолевых клеток / Старикова Е.Г., Клепцова Л.А. (Таширева Л.А.), Кайгородова Е.В. // Материалы XV межгородской конференции молодых

- ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» 21-22 апреля 2010 года, г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2010. – с. 160 – 161.
5. The role of hydrogen sulphide in apoptosis induction / Starikova E., Kleptsova L. (Tashireva L.), Jakushina V., Novitsky V., Ryazantseva N. // The 6th International Congress of Pathophysiology «Gene-environment interaction in health and disease», Montreal, 22-25 September, 2010. - Montreal, 2010. - P.70-71.
 6. Роль р38-зависимого пути в реализации апоптоза клеток линии Jurkat в условиях модуляции внутриклеточной газовой коммуникации / Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Осихов И.А., Калинин Ю.Г. // Материалы XVI межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» 20-21 апреля 2011 года, г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2011. – с. 154 – 156.
 7. Экспрессия генов *hsp* и *aven* при воздействии доноров сульфида водорода и оксида азота на клетки линии Jurkat / Таширева Л.А., Старикова Е.Г., Самалова Н.А., Ермишова А.В. // Материалы XVI межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» 20-21 апреля 2011 года, г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2011. – с. 162 – 164.
 8. Трансдукция апоптотического сигнала с участием монооксида углерода и сульфида водорода в клетках линии Jurkat / Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Рязанцева Н.В., Стариков Ю.В., Новицкий В.В. // Сборник статей второй международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», 26–28.10.2011, Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2011. – с. 150 – 152.
 9. Регуляция апоптоза клеток с использованием газовых транмиттеров (оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода) / Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Старикова Е.Г., Таширева Л.А. // Вестник науки Сибири. – 2011. – № 1 (1). – С. 635-640.
 10. p38 MAPK-dependent targets of hydrogen sulfide proapoptotic action in Jurkat cells / Starikova E., Tashireva L., Novitsky V., Ryazantseva N. // First European conference on the biology of hydrogen sulfide, Bratislava, Slovakia, 15-18 July, 2012. – p.84-85.
 11. Участие p38 MAPK в апоптотическом уменьшении объема Jurkat клеток, обработанных газотрансмиттерами / Starikova Ye.G., Tashireva L.A., Novitsky V.V., Ryazantseva N.V. // Бюллетень сибирской медицины. – 2013. – Т. 12. № 4. – С. 81.
 12. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе / Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Часовских Н. Ю.,

- Кайгородова Е.В., Старикова Е.Г., Стариков Ю.В., Радзивил Т.Т., Крат И.В. // **Цитология.** – 2009.- Т.51.№4. – С. 329-334. ИФ в РИНЦ 0,476.
13. Митогенактивированные протеинкиназы JNK и p38 – редокс-зависимые молекулярные мишени нарушения апоптоза при окислительном стрессе / Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Кайгородова Е.В., Часовских Н.Ю., Старикова Е.Г. // **Успехи физиологических наук.** – 2009. – Т. 40, № 2. – С. 3-11. ИФ в РИНЦ 0,500.
14. Роль сульфида водорода в регуляции апоптоза клеток / Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Старикова Е.Г., Клепцова Л.А. (Таширева Л.А.), Якушина В.Д., Кайгородова Е.В. // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2011. – Т. 151. № 6. – С. 646-649. ИФ в РИНЦ 0,408.
15. Роль внутриклеточных газовых трансммиттеров сульфида водорода и оксида азота в регуляции апоптоза нормальных и бласттрансформированных клеток / Старикова Е.Г., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Таширева Л.А. и др. // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2011. – Т. 10. № 6. – С. 40-44. ИФ в РИНЦ 0,331.
16. Внутриклеточные газовые посредники оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода участвуют в регуляции апоптоза / Рязанцева Н.В., Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Степовая Е.А., Стариков Ю.В., Осихов И.А., Новицкий В.В. // **Цитология.** – 2012. – Т. 54. № 2. – С. 105-111. ИФ в РИНЦ 0,476.
17. Монооксид углерода: роль в митохондриальном пути запуска апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat / Таширева Л.А., Старикова Е.Г., Бельдягина Е.В., Васильева О.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., // **Медицинская иммунология.** – 2012. – Т. 14. № 4-5. – С. 353-359. ИФ в РИНЦ 0,553.
18. Идентификация чувствительных к воздействию монооксида углерода молекулярных мишеней, ответственных за регуляцию G1 фазы клеточного цикла / Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Бельдягина Е.В., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. // **Сибирский онкологический журнал.** – 2012. – № 4. – С. 48-51. ИФ в РИНЦ 0,346.
19. Роль TNF-рецепторного пути реализации апоптоза в клетках линии Jurkat с участием газовых трансммиттеров / Таширева Л.А., Старикова Е.Г., Прохоренко Т.С., Васильева О.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. // **Цитокины и воспаление.** – 2012. – Т. 11. № 4. – С. 30-33. ИФ в РИНЦ 0,506.
20. Антипролиферативный потенциал монооксида углерода / Старикова Е.Г. // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2012. – Т. 1. № 4. – С. 68-71. ИФ в РИНЦ 0,331.
21. Оксид азота и сульфид водорода как p38-зависимые регуляторы экспрессии генов *xiap* и *aven* в опухолевых клетках линии Jurkat /

- Таширева Л.А., Старикова Е.Г., Новицкий В.В., Васильева О.А. и др. // **Сибирский онкологический журнал.** – 2012. – № 5 (53). – С. 23-27. ИФ в РИНЦ 0,346.
22. Внутриклеточные мишени проапоптотического влияния газовых трансмиттеров / Таширева Л.А., Старикова Е.Г., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. // **Вестник Российской академии медицинских наук.** – 2012. – № 10. – С. 77-81. ИФ в РИНЦ 0,641.
23. Участие редокс-сигнализации в опосредованной оксидом азота, монооксидом углерода и сульфидом водорода регуляции апоптоза и клеточного цикла / Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Васильева О.А., Якушина В.Д., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2013. – Т. 12. № 1. – С. 49-54. ИФ в РИНЦ 0,331.
24. Молекулярные механизмы регуляторного влияния сульфида водорода на прогрессию фаз клеточного цикла / Новицкий В.В., Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Рязанцева Н.В. // **Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.** – 2013. – Т. 33. № 2. – С. 5-9. ИФ в РИНЦ 0,388.
25. P38 MAPK-dependent targets of gaseous transmitters proapoptotic action in Jurkat cells / Starikova Ye.G., Tashireva L.A., Novitsky V.V., Ryazantseva N.V. // *American Journal of cancer science* – 2013. – Vol.2 – P. 1-12.
26. Nitric oxide donor NOC-5 increases XIAP and Aven level in Jurkat cells / Starikova Ye.G., Tashireva L.A., Novitsky V.V., Ryazantseva N.V. // **Cell Biology International.** – 2014. – doi: 10.1002/cbin.10262. ИФ в Web of Science 1,64
27. Средство и способ индукции апоптоза опухолевых клеток / Старикова Е.Г., Васильева О.А., Таширева Л.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. // RU 2488408, от 27.07.2013.

Список использованных сокращений

- АФК – активные формы кислорода
 мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота
 цГМФ – циклический гуанозин-монофосфат
 Araf-1 – apoptosis proteases activating factor1; фактор активирующий апоптотические протеазы 1
 Cdk – cyclin dependent kinase; циклин зависимая киназа
 CKI – cyclin-dependent kinases inhibitors; ингибиторы циклин-зависимых киназ
 CORM – CO releasing molecule; CO высвобождающая молекула
 HIF1 – hypoxia inducible factor 1; гипоксия-индуцибельный фактор
 MAPK - mitogen-activated protein kinase; митоген-активируемая протеинкиназа
 MDM –p53-inducible E3-ubiquitin-lygase able to degradation; p53-индуцибельная E3-убиквитин-лигаза, способная к деградации
 Rb – retinoblastoma protein; белок ретинобластомы
 TNFR1 – receptor of tumor necrosis factor I type; рецептор фактора некроза опухоли I типа
 xIAP – x-inhibitor apoptosis protein; x-протеин, ингибирующий апоптоз
 Δψ – митохондриальный трансмембранный потенциал