

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научные консультанты:
доктор медицинских наук,
профессор Рязанцева Н.В.

доктор медицинских наук,
академик РАН, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ
Новицкий В.В.

Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы	
1.1 Внутриклеточные газовые посредники – регуляторы клеточных функций.....	14
1.1.1 Оксид азота как участник внутриклеточной сигнальной трансдукции.....	16
1.1.2 Монооксид углерода как участник внутриклеточной сигнальной трансдукции.....	19
1.1.3 Сульфид водорода как участник внутриклеточной сигнальной трансдукции.....	22
1.1.4 Фармакологические агенты, содержащие газовые трансммиттеры, в качестве основных действующих веществ.....	26
1.2 Молекулярные механизмы, определяющие баланс апоптоза и пролиферации клеток.....	28
1.2.1 Молекулярные механизмы регуляции программированной гибели клеток.....	28
1.2.2 Молекулярные механизмы регуляции клеточного цикла.....	36
1.2.3 Регуляторные молекулы апоптоза и пролиферации клеток.....	41
1.2.3.1 p38 митоген-активируемая протеинкиназа.....	41
1.2.3.2 Транскрипционный фактор p53.....	42
1.3 Роль газотрансммиттеров в регуляции апоптоза и клеточного цикла.....	43
1.3.1 Физиологические мишени действия газов в регуляции апоптоза и клеточного цикла.....	43
1.3.2 Роль газотрансммиттеров в дизрегуляции апоптоза и пролиферации опухолевых клеток.....	46
Заключение.....	50
Глава 2. Материал и методы исследования	55
2.1. Материал исследования.....	55
2.1.1 Экспериментальные модели исследования.....	56
2.2 Методы исследования.....	58
2.2.1 Культивирование клеточной линии Jurkat.....	59
2.2.2 Выделение и культивирование моноклеарных лейкоцитов венозной крови.....	59

2.2.3 Культивирование клеток в условиях воздействия доноров газотрансмиттеров и ингибирования p38 MAPK-зависимых механизмов их действия.....	63
2.2.4 Оценка реализации апоптоза клеток.....	64
2.2.5 Оценка распределения клеток по фазам клеточного цикла.....	65
2.2.6 Оценка продукции активных форм кислорода.....	66
2.2.7 Оценка митохондриального трансмембранного потенциала.....	68
2.2.8 Оценка количества TNF R1-позитивных клеток.....	69
2.2.9 Оценка продукции TNF- α	70
2.2.10 Оценка уровня экспрессии мРНК генов белков-регуляторов апоптоза и клеточного цикла.....	71
2.2.11 Определение активности каспазы-3 и -9.....	75
2.2.12 Оценка содержания белков-регуляторов апоптоза и клеточного цикла.....	77
2.2.13 Статистический анализ результатов исследования.....	78
Глава 3. Направленность апоптотических изменений клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов в ответ на воздействие доноров газов оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода.....	80
3.1 Апоптоз клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов в ответ на воздействие доноров оксида азота.....	80
3.2 Апоптоз клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов в ответ на воздействие донора монооксида углерода.....	92
3.3 Апоптоз клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов в ответ на воздействие донора сульфида водорода.....	98
3.1.4 Молекулярные мишени, опосредующие дизрегуляцию апоптоза в опухолевых клетках.....	106
Глава 4. Молекулярные механизмы участия газовых трансммиттеров в дизрегуляции апоптоза и пролиферации опухолевых клеток.....	109
4.1 Распределение клеток по фазам клеточного цикла при воздействии доноров газов.....	109
4.2 Участие редокс-сигналикации в опосредуемой газами дизрегуляции апоптоза и клеточного цикла в опухолевых клетках.....	115
4.2.1 Особенности генерации активных форм кислорода при воздействии на клетки доноров газов.....	115

4.2.2 Роль p38 MAPK в опосредованной газовыми трансмитами дизрегуляции апоптоза и пролиферации клеток линии Jurkat.....	123
4.3 Влияние газотрансмиттеров на процессы реализации апоптоза опухолевых клеток.....	134
4.3.1 Молекулярные механизмы митохондриальной дисфункции при воздействии на клетки доноров газов.....	134
4.3.2 Нарушения регуляция активности каспаз 3 и 9 при воздействии на клетки линии Jurkat доноров газотрансмиттеров.....	146
4.4 Нарушения регуляции продолжительности G1 фазы клеточного цикла клеток линии Jurkat при воздействии доноров газов.....	156
4.5 Механизмы изменения содержания ключевых белков-регуляторов апоптоза и клеточного цикла при воздействии на клетки линии Jurkat доноров газов.....	165
4.6 Молекулярные мишени действия p38 MAPK в опосредованной газами дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток.....	183
Заключение.....	192
Выводы.....	198
Список использованных сокращений.....	201
Список литературы.....	204

Введение

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 трансммиттеров различными патологическими и физиологическими процессами, в частности, апоптозом и пролиферацией «здоровых» и опухолевых клеток.

Баланс соотношения запрограммированная 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 трансммиттеров 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 с [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]. Продemonстрировано, 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 А 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 достаточно не изучены. Установлено, что H₂S может иметь как индуцирующее, так и ингибирующее воздействие на процессы реализации апоптоза и пролиферации клеток [Kasparek M.S. et al., 2008]. Молекулярные мишени, детерминирующие характер клеточного ответа на воздействие H₂S, в настоящее время не определены.

Таким образом, данные, характеризующие молекулярные механизмы влияния NO, CO и H₂S на реализацию программированной гибели клеток и прогрессию фаз клеточного цикла, малочисленны и требуют дальнейшего изучения.

Цель исследования

Установить роль внутриклеточных газовых трансммиттеров (NO, CO и H₂S) в механизмах дисрегуляции апоптоза и пролиферации опухолевых клеток линии Jurkat.

Задачи исследования:

1. Оценить общие закономерности и особенности влияния доноров газовых трансммиттеров NO, CO и H₂S 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 H₂S (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 H₂S 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 H₂S, 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 H₂S *in vitro*.
 5. Определить участие доноров газовых транмиттеров NO, CO и H₂S в регуляции G₁-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 H₂S *in vitro* в регуляции апоптоза и клеточного цикла в клетках линии Jurkat.

Научная новизна

Получены приоритетные данные о роли газовых транмиттеров (NO, CO и H₂S) 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 χ IAP 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 транмиттеров. 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 транмиттером 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 транмиттеров 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 специфической 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 со специфической 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 моноклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров, и клеточная линия Jurkat (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург). В качестве доноров внутриклеточных газовых трансммиттеров применялись нитропруссид натрия (SNP) и 3-(аминопропил)-1-гидрокси-3-изопропил-2-оксо-1-триазин (NOC-5), гидросульфид натрия (NaHS), а также Ru(CO)₃Cl₂ 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. 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).

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, bax, 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 мМ 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 мМ 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.

Апробация и внедрение результатов работы

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 трансммиттеров 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 проекта «Идентификация молекулярных мишеней регуляции апоптоза и дифференцировки клеток крови при патологии инфекционного и неинфекционного генеза» (Грант Президента РФ НШ-614.2012.7) и ««Роль генетически детерминированных реакций системы крови в патоморфозе инфекционных заболеваний»» (Грант Президента РФ 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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Внутриклеточные газовые посредники – регуляторы клеточных функций

Последние десятилетия ознаменованы открытием новой группы сигнальных молекул – газовых мессенджеров, включающей в настоящее время оксид азота (NO), монооксид углерода (CO) и сульфид водорода (H₂S). Данные молекулы обладают высокой реакционной способностью и играют важную роль в регуляции различных физиологических и патологических реакций.

Существует ряд специфических свойств, характерных для газовых посредников [Wang R., 2002]. Во-первых, все известные на сегодняшний день газовые мессенджеры являются простыми молекулами. Во-вторых, данные вещества легко проникают через клеточные мембраны, а значит внутриклеточные эффекты газовых мессенджеров не связаны с распознаванием мембранных рецепторов. В-третьих, они образуются эндогенно с участием ферментов, что делает генерацию газов высоко регулируемым процессом. В-четвертых, внутриклеточное действие газовых посредников сопряжено с химической модификацией белков-мишеней.

В настоящее время известно, что внутриклеточные газы необходимы для функционирования практически всех органов и тканей. Важнейшими из физиологических эффектов оксида азота являются поддержание сосудистого тонуса, участие в качестве нейротрансмиттера в неадренергической и холинергической синаптической передаче, регуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток [Ванин А.Ф., 2000]. Монооксид углерода вовлечен в регуляцию тонуса сосудов и ангиогенеза, передачу импульсов в мозге. СО ингибирует провоспалительные сигнальные пути и способствует индукции антиинфламаторных и антипролиферативных механизмов. Сульфид водорода участвует в индукции потенциала действия в гиппокампе, развитии мозга и регуляции артериального давления [Wang R., 2002]. Моделирование различных патологических процессов показало, что сульфид

водорода защищает клетки и ткани от гипоксии при артериальной и легочной гипертензии, ишемии/реперфузии миокарда, эректильной дисфункции, колите и травмах мозга. При этом H_2S усугубляет повреждение тканей при септическом шоке, панкреатите и ишемии сердца [Lowicka E., Beltowski J., 2007].

Известно, что классические мессенджеры передают сигнал по принципу каскада. Газовые мессенджеры химически модифицируют внутриклеточные протеины, изменяя таким образом клеточный метаболизм более быстрым способом. При этом, если в случае оксида азота и монооксида углерода один из главных физиологических эффектов - расслабление сосудистой стенки - обусловлен взаимодействием с гуанилатциклазой, то для сульфида водорода аналогичный эффект достигается за счет изменения активности калиевых АТФ-чувствительных каналов. Показано, что оксид азота влияет на жизнедеятельность клеток за счет связывания с железом гем-содержащих транскрипционных факторов [Olson S.Y., Garbana H.J., 2008]. Схожий механизм был продемонстрирован для монооксида углерода, однако способность данного вещества взаимодействовать с гемом значительно ниже, чем у NO. Подобным образом регулируется активность гуанилатциклазы, а также ряда митохондриальных белков [Tsuburai T. et al., 2002]. Оксид азота также вступает в реакцию нитрозилирования с сульфгидрильными группами цистеина. К белкам, нитрозилированным на базальном уровне, относятся метаболические ферменты, ионные каналы, рецепторы нейротрансмиттеров и структурные протеины [Hess D.T. et al., 2005]. Молекулярные механизмы действия сульфида водорода опосредованы реакциями сульфгидрирования (по аналогии с нитрозилированием для NO) [Sen N., Snyder S.H., 2010].

Сходные черты, позволяющие объединить газы в одну группу (липофильные свойства, ферментативный синтез) при разной химической активности, создают предпосылки для сравнительного изучения роли их в регуляции физиологических и патологических процессов.

1.1.1. Оксид азота как участник внутриклеточной сигнальной трансдукции

Наиболее полно в настоящее время в литературе освещены вопросы, касающиеся механизмов образования, утилизации и участия в процессах сигнальной трансдукции оксида азота. Последний является липофильной молекулой, обладающей, несмотря на крайнюю простоту строения, большим набором функций в организме [Львова О.А. и соавт., 2010]. Оксид азота в организме животных и человека синтезируется из L-аргинина с помощью цитохром Р-450-подобных гемопroteинов – NO-синтаз. Молекулы NO-синтаз содержат домены с оксигеназной и редуктазной активностью и при синтезе NO присоединяют молекулярный кислород к конечному атому азота в гуанидиновой группе L-аргинина [Марков Х.М., 2000]. По характеру индукции и действию NO-синтазы подразделяются на ряд типов, каждая из которых имеет свои особенности в механизмах действия, локализации и в биологическом значении для организма. Выделяют Ca^{2+} -независимую (индуцибельную, iNOS) NO-синтазу (2 тип) и менее мощные конститутивные (ингредиентные) Ca^{2+} - и кальмодулинзависимые NO-синтазы – нейрональная (1 тип, nNOS), эндотелиальная или макрофагальная (3 тип, eNOS) изоформы. Последние два типа (1 и 3) NO-синтаз считаются конституциональными, поскольку экспрессируются постоянно и в условиях физиологической нормы, и при патологии. nNOS является цитозольным белком, а eNOS – мембраносвязанным белком [Терещенко С.Н. и соавт., 2009]. Экспрессия индуцибельных NOS существенно возрастает под влиянием различных цитокинов [Ванина А.Ф., 2000; Голиков П.П., 2004].

Биологические эффекты оксида азота определяются химическими взаимодействиями с молекулами-мишенями. Химическая биология NO предполагает разделение данных реакций на две категории: прямые и опосредованные взаимодействия [Tennyson A.G., Lippard S.J., 2011]. Прямые эффекты оксида азота представляют собой химические реакции, позволяющие NO непосредственно взаимодействовать с молекулами-

мишенями. К прямым эффектам оксида азота относится активация растворимой гуанилатциклазы (sGC, КФ 4.6.1.2) с образованием циклического 3',5'-гуанозинмонофосфата (цГМФ) [Derbyshire E.R., Marletta M.A., 2012]. Связывание оксида азота с железом гема sGC индуцирует конформационное изменение, которое смещает железо из плоскости порфиринового кольца, тем самым увеличивая активность растворимой гуанилатциклазы в 400 раз [Северина И.С., 2002; Garthwaite J. et al., 2010; Martínez-Ruiz A. et al., 2011]. В литературе описаны четыре основных внутриклеточных эффекта цГМФ: активация цГМФ-зависимой протеинкиназы ((PKG) cGMP-dependent protein kinase G), цАМФ-зависимой протеинкиназы, фосфодиэстеразы (ФДЭ) и изменение проницаемости кальциевых каналов [Potter L.R., 2011].

Непрямые эффекты оксида азота могут быть разделены на основании химии активных форм азота на две категории: нитрозилирующий и окислительный стресс [Tennyson A.G., Lippard S.J., 2011]. Окислительные реакции представляют собой процесс, когда окислительный статус молекул-мишеней увеличивается. Нитрозилирующий стресс предполагает присоединение нитрозоний иона $[NO^+]$ к тиоловым группам аминокислот или к гидроксильным группам. Активные формы кислорода (гидроксил радикал или супероксид анион), продуцируемые в реакции Фентона, ассоциированы с окислительным стрессом. Пероксинитрит и оксид азота (IV) (NO_2), образующиеся при взаимодействии оксида азота с супероксид анионом, являются сильными окислителями. При этом N_2O_3 , генерируемый в ходе реакции оксида азота с кислородом (аутоокисление), является окислителем средней силы и реагирует с нуклеофильными молекулами, такими как амины и тиолы [Toledo J.C. Jr., Augusto O., 2012].

Реакционный потенциал взаимодействия оксида азота с активными формами азота контролируется уровнем диффузии, приводя к быстрой конверсии окислительного стресса в нитрозилирующий. Таким образом, баланс между окислительными и нитрозилирующими реакциями зависит от

концентрации NO. При низком внутриклеточном уровне NO будет происходить окисление субстратов, тогда как высокая концентрация NO в клетке приводила к нитрозилированию. Огромное значение также имеет компартментализация образующихся активных форм азота. Близость или транслокация молекул мишеней к источнику оксида азота является основополагающим фактором в опосредованной оксидом азота сигнальной трансдукции [Janssen-Heininger Y.M. et al., 2008].

S-нитрозилирование является широко распространенной окислительной модификацией тиоловых групп цистеина оксидом азота, опосредуя тем самым сигнальные свойства данной молекулы. Большое число экспериментальных данных свидетельствует о том, что S-нитрозилирование и S-нитротииолы (SNOs) играют существенную роль в регуляции различных физиологических и патологических процессов и состояний [Foster M.W., et al., 2003.]. Специфические цистеиновые остатки более чем ста протеинов подвержены S-нитрозилированию, что доказывает важность данного механизма в системе сигнальной трансдукции оксида азота [Hess D.T. et al., 2005]. По аналогии с фосфорилированием киназами, S-нитрозилирование за счет NO синтаз влияет на активность белков, белок-белковые взаимодействия и локализацию протеинов. Более того, S-нитрозилирование вовлечено в трансдукцию сигнала от всех классов рецепторов, включая GPCR, RTK, TNF, Toll, глутаминергические и др., а также в трансдукцию сигнала между внутриклеточными компартментами в случае модификации транскрипционных факторов в митохондриях и ядре клетки [Janssen-Heininger Y.M. et al., 2008].

Окислители, участвующие в физиологической трансдукции сигнала, должны проявлять субстратную специфичность и приводить к обратимому окислению. Высоко активные окислители, такие как озон, гипохлорная кислота, а также гидроксил радикал, неспецифически окисляют биомолекулы, образуя необратимые окислительные модификации (например, 3-нитротирозин, карбонилы белков). Данные модификации протеинов

обычно приводят к аберрантной активации каскадов сигнальной трансдукции, индуцируя патофизиологические эффекты. Напротив, физиологические оксиданты, такие как NO, вовлечены в обратимую цистеин-опосредованную модификацию белков, участвующую в физиологическом контроле большого числа внутриклеточных сигнальных путей.

1.1.2. Монооксид углерода как участник внутриклеточной сигнальной трансдукции

Монооксид углерода (CO) в настоящее время рассматривается уже не как молекула с исключительно токсическим действием или один из продуктов распада гема, а как один из представителей межклеточной коммуникации [Коржов В.И. и др., 2010].

Продуцируется монооксид углерода оксигеназой гема (гемоксигеназой). Известны три изоформы гемоксигеназ (НО-1, НО-2, НО-3). Данные ферменты расщепляют протогем IX с образованием биливердина – IX α , двухвалентного железа и оксида углерода. Индуцибельный изофермент НО-1 (известен как белок теплового шока HSP32) играет важную роль в адаптации клеток и тканей в ответ на действие стрессорных факторов различной природы. НО-1, экспрессируемая в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудистой стенки, контролирует образование CO, необходимого для размножения клеток и роста капилляров. В низких концентрациях CO рассматривают как фактор цитопротекции и модулятор сосудистого тонуса при гипоксии. Конститутивная изоформа НО-2, имеющаяся во многих клетках, определяет скорость деградации гема в норме. Максимально она представлена в нейронах гиппокампа и имеет такое же распределение, как и растворимая гуанилатциклаза, что предполагает участие монооксида углерода в передаче информации в ЦНС [Zuckerbraun B.S., 2008]. НО-3 также является конститутивной изоформой гемоксигеназы. Роль НО-3 в деградации гема *in vivo* четко не определена, так как данный

фермент обладает более высокой константой Михаэлиса к протогему IX, чем два других изоэнзима [Fang J. et al., 2003].

СО равномерно диффундирует от места своего синтеза и легко проникает через билипидный слой мембран любых клеток. Распространение СО лимитируется коротким временем его жизни. Механизмы сигнальной трансдукции с участием монооксида углерода опосредованы непосредственным взаимодействием с внутриклеточными белками [Коржов В.И. и др., 2010]. Как и NO, монооксид углерода активирует растворимую гуанилатциклазу, что ведет к многократному увеличению продукции цГМФ, однако, его способность приводить к этому эффекту в 30-100 раз ниже, чем у NO. Указанное свойство СО влиять на гуанилатциклазу имеет высокую физиологическую значимость. Полагают, что таким образом СО способствует усилению вызванной оксидом азота активации гуанилатциклазы [Tsuburai T. et al., 2002].

Возможно, СО влияет на релаксацию сосудов за счет ингибирования функции оксидоредуктаз (к данному классу ферментов относится цитохром P450). Данное предположение основано на факте изменения посредством монооксида углерода цитохром P450-зависимого синтеза эндогенных вазоконстрикторных веществ [Wang C.Y., 1998.].

Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что монооксид углерода оказывает значительное влияние на функционирование митохондрий. При этом работы, выполненные *in vivo*, доказывают, что СО связывается с цитохром с оксидазой [Piantodosi C.A., 2002]. Воздействие экзогенного СО на эндотелий сосудов и митохондрии *in vivo* приводят к окислительному стрессу в исследуемых моделях. При этом неизвестно, является ли полученный эффект результатом гипоксии-реоксигенации или последствием непосредственного влияния монооксида углерода на функционирование гем-содержащих белков.

Окислительный стресс в эндотелии кровеносных сосудов отмечается при воздействии малых доз СО и может продолжаться в течение нескольких

часов. Высокие концентрации СО повышают внутриклеточную продукцию перекиси водорода в мозге, ассоциированную с увеличением содержания гидроксил радикала и снижением уровня восстановленного глутатиона. Возникающий окислительный стресс под влиянием СО отличается от такового, индуцированного гипоксией, по крайней мере, в тканях мозга. Полученные результаты позволяют предполагать наличие специфического механизма генерации АФК при действии СО *in vivo*, играющего определенную роль в трансдукции сигналов к клеточной смерти, репарации и пролиферации [Piantadosi С.А., 2002].

Влияние повышения внутриклеточной концентрации СО на жизнедеятельность митохондрий может иметь значение как в физиологических условиях, так и при патологических состояниях. Однако, помимо увеличения продукции АФК митохондриями, СО может предохранять данные органеллы от окислительного стресса. Так, использование СО-высвобождающих соединений показало, что СО может улучшать респираторный индекс изолированных митохондрий и уменьшать окислительный стресс [Sandouka A. et al., 2006].

Влияние монооксида углерода на клеточный метаболизм может быть опосредовано восстановительными протективными свойствами данного газа. Так, снижение выживаемости крысиных кардиомиоцитов после паркват-индуцированного окислительного стресса или при гипоксии-реоксигенации может быть значительно отменено при воздействии СО-высвобождающей молекулы (CORM-3). Таким образом, роль СО в контроле окислительно-восстановительных реакций в системах, генерирующих АФК, может иметь огромное значение в определении исхода состояний гипоксии или ишемии, поскольку продукция АФК при этих состояниях увеличена [Goyal P. et al., 2004; Liu J.Q., 2005]. Возможно, СО успешнее конкурирует за связывание с гем-содержащими белками с O_2 и NO при снижении внутриклеточной концентрации кислорода. Данное предположение верно, в частности, в отношении NADPH оксидазы, поскольку активность данного фермента

напрямую зависит от парциального давления кислорода, обуславливая эндотелиальную дисфункцию и некоторые сосудистые заболевания [Li J.M., Shah A.M., 2004; Fresquet F. et al., 2006]. Необходимы дальнейшие исследования влияния контролируемого введения монооксида углерода на клетки и ткани, находящиеся в условиях пониженного потребления кислорода, для определения антиоксидантного потенциала данного газа в указанных условиях [Desmard M., 2007].

Таким образом, СО за счет взаимодействия с гем-содержащими белками митохондрий может значительно изменять редокс-статус клетки. Генерируемые под влиянием монооксида углерода АФК могут вносить вклад в модуляцию систем сигнальной трансдукции при различных патологических состояниях.

1.1.3. Сульфид водорода как участник внутриклеточной сигнальной трансдукции

В последние годы были накоплены доказательства широкого спектра биологических функций сульфида водорода (H_2S). Основная из них – роль внутриклеточного газового мессенджера (наряду с оксидом азота и монооксидом углерода) [Lowicka E., Beltowski J., 2007].

Сульфид водорода образуется в значительных количествах в большинстве тканей. Высокий уровень продукции данного газа был отмечен в головном мозге, сердечно-сосудистой системе, печени и в почках. Единственным субстратом для продукции эндогенного сульфида водорода является L-цистеин. Один из путей катаболизма цистеина связан с конденсацией гомоцистеина и с продукцией сульфида водорода. Катализаторами для данного процесса являются два пиридоксаль-5'-фосфат (витамин В6)-зависимых фермента: цистатионин-β-синтаза и цистатионин-γ-лиаза. Цистатионин-β-синтаза в основном действует в центральной нервной системе, а цистатионин-γ-лиаза – в клетках гладкой мускулатуры сосудистой стенки и в кардиомиоцитах. В печени и в почках работают оба фермента

[Резник В.П., 2009]. Третьей ферментативной системой, участвующей в образовании сульфида водорода является 3 меркаптопируват сульфур трансфераза (3MST). Данный фермент используют 3-меркаптопируват в качестве субстрата [Mikami Y. et al., 2011]. Как и NO, сульфид водорода является мощным вазодилататором. Фермент CSE, также как eNOS и HO-2, локализован в эндотелиальном слое кровеносных сосудов. Холинергическая релаксация кровеносных сосудов значительно снижена у CSE-дефицитных животных. Нокаут CSE приводит к повышению кровяного давления, сопоставимому с таковым при нокаутах eNOS [Mustafa A.K. et al., 2009].

Активация АТФ-чувствительных калиевых каналов представляет собой основной механизм влияния сероводорода на сокращение гладкомышечных клеток. Благодаря ему, происходит вазодилатация при ишемии\реперфузии [Bhatia M., 2005]. Активация калиевых АТФ-чувствительных каналов может быть опосредована взаимодействием сульфида водорода с несколькими остатками цистеина в составе данного комплекса [Giangiacomo L. et al., 2005]. Было высказано также предположение о том, что активация K_{ATP}^{+} -каналов является результатом взаимодействия сульфида водорода с гем-содержащими протеинами цитохром-с-оксидазой, миоглобином и гемоглобином, которые снижают содержание внутриклеточного АТФ и тем самым активируют K_{ATP} -каналы [Hughes M.N. et al., 2009; Wagner F., 2009] (рис.1).

Гемоглобин, миоглобин, каталаза, а также лактопероксидаза содержат остатки гистидина в непосредственной близости к гемму, что может играть ключевую роль в формировании сульфгемма. В цитохром-с-оксидазе остатки гистидина не имеют необходимую ориентацию для непосредственного образования сульфгемма. При этом сульфид водорода восстанавливает железо гема в составе цитохром-с-оксидазы. В цитохроме с гем координирован метионином и гистидином в дистальных и проксимальных сайтах, соответственно. Механизм, за счет которого сульфид водорода восстанавливает гемовый центр цитохрома с, также неизвестен. Возможно,

сульфид связывается и восстанавливает железо гема, тем самым изменяя окислительно-восстановительный статус белка в целом [Pietri R. et al., 2010].

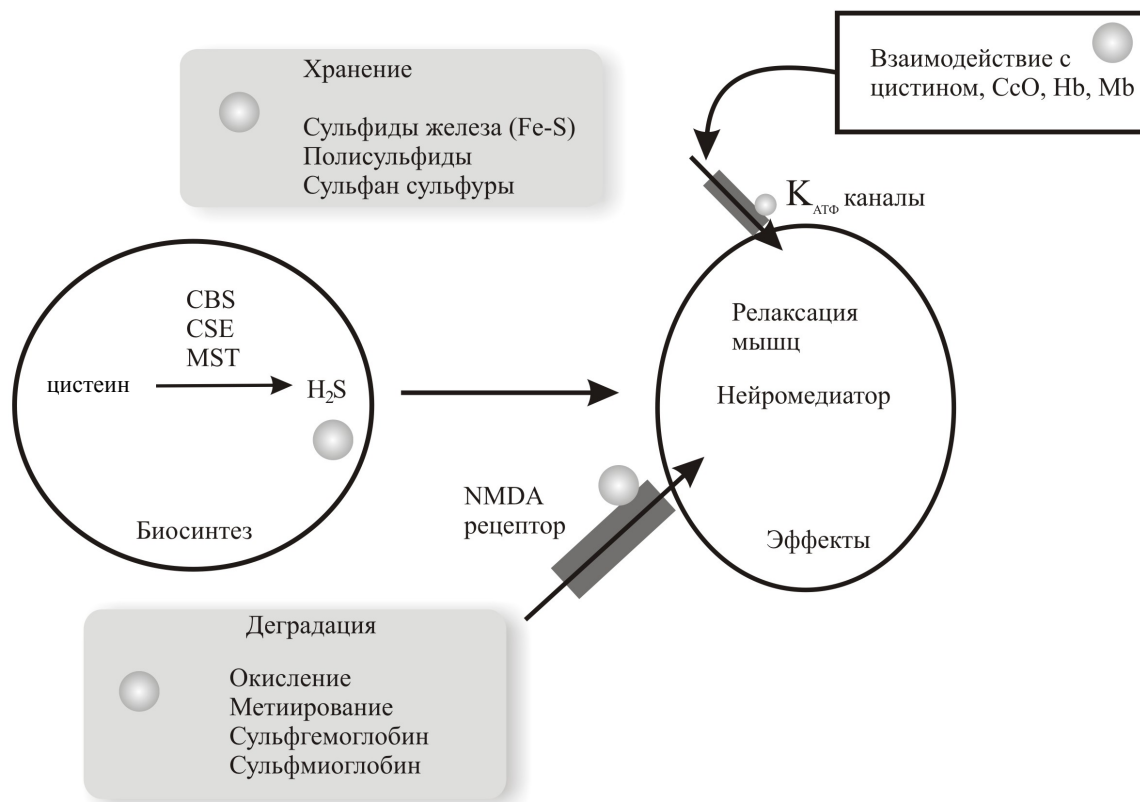


Рис.1 Образование, молекулярные мишени и эффекты действия сульфида водорода [по данным R. Pietri et al., 2010]

Было показано, что сульфид водорода передает сигнал путем сульфгидрирования SH групп цистеина белков-мишеней по аналогии с нитрозилированием. При этом нитрозилирование приводит к ингибированию активности белков, а сульфгидрирование, напротив, индуцирует ферменты. Реакция сульфгидрирования протеинов может происходить только в присутствии окислительного эквивалента, иными словами только в условиях повышения внутриклеточного количества прооксидантов [Jacob C., 2008; Kabil O., Banerjee R., 2010]. Окислителями могут выступать супероксид анион и перекись водорода, постоянно генерируемые в клетках. Так, перекись водорода продуцируется не только в митохондриях, но и в пероксисомах и цитозоле с участием СОД, NADPH-оксидаз, ксантин оксидаз,

сульфгидрил оксидаз и моноаминоксидаз [Bae Y.S. et al., 2011]. При физиологических условиях большинство тиоловых групп цистеина протонированы (-SH) и потому обладают низкой реакционной способностью связывания с H_2O_2 . Однако, в некоторых протеинах цистеиновые остатки фланкированы основными аминокислотами, и цистеиновые SH-группы имеют высоко реакционно-способный тиолат анион (-S⁻). Данный элемент может специфически подвергаться H_2O_2 -опосредованному S-сульфгидрированию [Jones D.P., 2008; Nagy P., Winterbourn C.C., 2010]. Возможно, сульфгидрирование играет важную роль в регуляции жизнедеятельности нейтрофилов, образующих гипохлорную кислоту в качестве окислительного эквивалента для реакции сульфгидрирования [Nagy P., Winterbourn C.C., 2010].

Одной из внутриклеточных мишеней сероводорода является цитохром c [Wang R., 2002]. Токсический эффект действия H_2S связан с ингибированием митохондриального дыхания и представляет собой возможный механизм регуляции потребления кислорода клеткой. Сероводород обладает антиоксидантными свойствами, благодаря наличию SH-групп, способных к окислению дисульфидных связей. Показано, что антиоксидантные цитопротективные свойства сульфида водорода реализуются за счет утилизации пероксинитритов [Huyske M.M., Gaskins H.R., 2004]. Однако было установлено, что сероводород лишь частично мимикрирует свойства тиол-протективных агентов [Lowiska E., Beitowski J., 2007].

Было показано, что сульфид водорода защищает нейроны от окислительного стресса за счет восстановления уровня глутатиона, сниженного за счет потребления активных форм кислорода [Kimura Y. and Kimura H., 2004; Whiteman M. et al., 2004; Whiteman M., 2005; Kimura Y. et al., 2006; 2010]. Сульфид водорода повышает транспорт цистина и цистеина за счет увеличения активности X_{ct} -цистеин/глутаматных антипортеров и X_{AG} -аминокислотных транспортеров, увеличивая таким образом концентрацию

субстрата для продукции глутатиона. Сульфид водорода увеличивает также активность с-глутамилцистеинсинтетазы - фермента, участвующего в синтезе глутатиона. За счет этих интегративных эффектов H_2S повышает уровень глутатиона в клетках, и данный эффект становится более очевидным в условиях окислительного стресса [Kimura Y. and Kimura H., 2004; Kimura Y. et al., 2010].

Таким образом, данные литературы свидетельствуют о том, что влияние газов на жизнедеятельность клеток сопряжено с изменением их окислительно/восстановительного статуса. При этом не вызывает сомнений факт наличия специфических мишеней действия газовых трансммиттеров. Однако, учитывая модуляцию уровня активных форм кислорода при повышении внутриклеточного содержания газотрансммиттеров, открытым остается вопрос: являются ли изменения редокс-статуса клетки побочным эффектом действия газов или же необходимым вспомогательным элементом опосредуемой газами передачи внутриклеточного сигнала.

1.1.4. Фармакологические агенты, содержащие газовые трансммиттеры в качестве основных действующих веществ

Широкий спектр биологических активностей газовых трансммиттеров обуславливает интерес исследователей к созданию лекарственных веществ, модулирующих внутриклеточную концентрацию данных соединений.

В клинической практике широко используются лекарственные агенты, высвобождающие NO. Данные молекулы представляют собой субстанции, способные транспортировать и высвободить оксид азота в физиологических условиях в различных областях организма [Gasco A. et al., 2005]. Доноры NO, наиболее широко используемые в клинической практике, представляют собой органические нитраты; при этом также широко применяется нитропруссид натрия, состоящий из комплекса NO-металл [Scatena R. et al., 2010]. Самым изученным органическим нитратом в настоящее время является глицеринтринитрат (GTN), также известный как

нитроглицерин [Miller M. R. et al., 2007.]. Данное вещество наиболее часто используется для лечения острой боли, ассоциированной со стенокардией. Медленно высвобождающие NO-вещества, такие как изосорбид (ISMN), часто используются для лечения хронической стенокардии. SNP применяются, в основном, для внутривенной инфузии с целью быстрого снижения артериального давления при гипертоническом кризе [Klemenska E., Bersewicz, A., 2009.].

В настоящее время проходят клинические испытания такие доноры оксида азота как диазениумдиалаты (NONO), S-нитротиолы, фуроксаны и бензофуроксаны. Данные вещества не применяются в настоящее время в рутинной клинической практике, однако обладают доказанной биологической активностью. NONO обладают способностью расслаблять сосуды, ингибировать коагуляцию крови и пролиферацию гладкомышечных клеток [Miller M.R., Megson I.L., 2007; Scatena R. et al., 2010]. Были идентифицированы эндогенные S-нитротиолы, что предполагает некоторые преимущества использования таких S-нитротиолов, как доноров NO. Так, к данным преимуществам можно отнести тканевую специфичность и антиагрегантное действие [Scatena R. et al., 2010]. NO-высвобождающие фуроксаны и некоторые бензофуроксаны характеризуются сосудорасширяющей и антиагрегантной активностью [Al-Sadoni H.H., Ferro A., 2004; Cerecetto H., Porcal W., 2005].

Другой представитель группы газотрансмиттеров – монооксид углерода - нашел свое применение в газообразной форме и в виде молекул, высвобождающих данный газ [Aberg A. M., 2008]. Вдыхание газообразного CO в концентрациях от 20 до 500 ppm приводит к цитопротективному эффекту у мышей. Схожий эффект показан при хранении трансплантируемых органов в атмосфере, богатой CO [Nakao A. et al., 2006]. Вдыхание CO защищает от ишемического повреждения легких за счет снижения отложения фибрина в микрососудах, а также за счет угнетения выхода нейтрофилов в альвеолы [Fujita T. et al., 2001]. Однако вдыхание CO в

концентрациях 200-500 ppm обладает нейротоксическим эффектом [Mishra S. et al., 2006].

Разработка соединений, способных транспортировать и высвобождать CO, является мощной альтернативой применению газообразного монооксида углерода [Foresti R. et al., 2008; Motterlini R., Otterbein L.E., 2010; Foresti R., Motterlini R., 2010]. Молекулы, высвобождающие CO (CORM), обладают противовоспалительной, антимикробной активностью, могут быть использованы для коррекции сосудистого тонуса и хранения органов перед трансплантацией [Sawle P. et al., 2005; Vera T. et al., 2005; Freitas A. et al., 2006].

В настоящее время вторую фазу клинических испытаний проходит донор сульфида водорода Na_2S . Предполагается использовать данное вещество в качестве кардиопротективного средства [Predmore B.L. et al., 2012]. Разрабатываются вещества, способные к медленному высвобождению H_2S [Whiteman M. et al., 2004; Whiteman M., 2005].

Таким образом, в настоящее время доноры газовых трансмиттеров успешно используются в клинической практике. Значительный спектр биологических активностей газов позволяет предполагать расширение области применения фармакологических агентов на основе данных соединений.

1.2 Молекулярные механизмы, определяющие баланс апоптоза и пролиферации клеток

1.2.1 Молекулярные механизмы регуляции программированной гибели клеток

Апоптоз (программированная клеточная гибель) необходим для поддержания постоянства численности клеточных популяций. Он играет ключевую роль в регуляции развития клеток и тканей, в обеспечении адекватного иммунного ответа, в освобождении организма от поврежденных клеток и др. 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].

Каспазы, интерлейкин-1 β – конвертирующие ферменты семейства протеаз, проявляют высокую степень гомологии к гену клеточной смерти CED-3. В настоящее время идентифицированы 14 членов данного семейства, обладающих рядом специфических характеристик: все они являются аспартат-специфичными цистеиновыми протеазами; имеют консервативный пентапептидный активный сайт «QACXG» (X может быть заменен на R, Q или D); их прекурсоры являются зимогенами, известными как прокаспазы. N-конец продомена в прокаспазах содержит высоко вариабельную структуру, ответственную за активацию каспаз; все они способны к аутоактивации и активации других каспаз с образованием гетеродимера из большой и малой субъединиц, а два гетеродимера формируют ферментативно активный гетеротетрамер [Launay S. et al., 2005]. Основываясь на гомологии аминокислотных последовательностей, каспазы подразделяют на три подгруппы:

- 1) активаторы апоптоза (каспазы -2, -8, -9, -10);
- 2) эффекторы апоптоза (каспазы -3, -6, -7);
- 3) медиаторы воспаления (каспазы -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14).

Существуют два основных пути, за счет которых происходит активация каспаз: индуцированный сигналом смерти рецептор-ассоциированный путь и стресс-индуцированный, ассоциированный с митохондриями, вариант (каспаза-9 зависимый).

Сигналы клеточной смерти, такие как Fas лиганд (FasL) и фактор некроза опухолей (TNF), специфически распознаются соответствующими рецепторами (Fas и TNF рецепторы) на плазматической мембране. Затем Fas связывается с Fas-ассоциированным доменом смерти (FADD) (или TNF-

ассоциированным доменом TRADD), что приводит к агрегации FADD. Последние взаимодействуют с DEDs в продомене прокаспазы-8, индуцируют олигомеризацию прокаспазы-8, локализованной на внутренней стороне клеточной мембраны. Затем формируется массивный молекулярный комплекс, известный как комплекс, индуцированный сигналом смерти (DISC). В DISC два линейных участка прокаспазы-8 взаимодействуют друг с другом с последующей аутоактивацией прокаспазы-8 в каспазу-8. Дальнейшие варианты запуска апоптоза с участием каспазы-8 варьируют в зависимости от типа клеток. В клетках I типа (некоторые линии лимфоидных клеток) происходит массивная активация каспазы-8, которая может напрямую активировать эффекторные каспазы. В клетках типа II (все клетки, не принадлежащие к типу I) каспаза-8 активируется незначительно и неспособна активировать прокаспазу-3 напрямую. В данном случае происходит активация пути, ассоциированного с митохондриями, за счет превращения локализованного в цитозоле неактивного белка Bid (проапоптотический член семейства Bcl-2) в активную форму tBid. Последний индуцирует митохондриальный путь апоптоза: выход из митохондрий цитохрома c, апоптоз-индуцирующего фактора AIF и других молекул [Fu Y.F., Fan T.J., 2002; Arnoult D. et al., 2003; Lü C.X. et al., 2003; Wang Z.B. et al., 2005]

В ответ на различные стрессовые воздействия в цитозоле активируются проапоптотические протеины, формирующие поры пермеабилizационного перехода в митохондриальных мембранах (MPTPs). Митохондриальные поры образуются при взаимодействии белков VDAC, ANT и циклофилина D (CypD). При этом протеинам семейства Bcl-2 принадлежит ключевая роль в регуляции проницаемости данных каналов. Антиапоптотические члены семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A1) способны гетеродимеризоваться с просуицидальными белками и предотвращать их воздействие на митохондрии, а также изменять ион-проводящую активность ANT [García-Sáez A.J., 2012]. К проапоптотическим протеинам семейства

Bcl-2, не имеющим самостоятельной пороформирующей активности, относят так называемые BH3-белки (Bim, Puma, Bid, Bad, Bik, Bmf, Hrk, Noxa). Последние связывают и нейтрализуют антисуицидальные протеины данного семейства, способствуя усилению апоптоза. Белки Bax и Bak способны олигомеризоваться с образованием пор в митохондриальных мембранах, а также участвовать в формировании каналов наряду с VDAC, ANT и циклофилином D (CypD). При этом Bax в неактивном состоянии находится в цитозоле клеток и перемещается в митохондриальную мембрану только после стрессового стимула. В настоящее время неизвестно каким образом Bax «находит дорогу» к митохондриям, что именно привлекает данный белок к наружной мембране данных органелл (определенные липиды или формирование особых белковых комплексов). Было показано, что большие олигомеры Bax собираются в кластеры рядом с митохондриальной мембраной, а затем транслоцируются в нее [Kilbride S.M., Prehn J.H., 2012]. В большинстве моделей апоптоза, индуцированном повреждением ДНК или активацией p53, пермеабелизация митохондриальных мембран происходит одновременно или несколько позже митохондриальной транслокации Bax [Scorrano L., Korsmeyer S.J., 2003]. Протеин Bak также способен перемещаться в описанные кластеры. Формирование данных комплексов происходит независимо от активации каспаз и полностью специфически ингибируется Bcl-XL [Nechushtan A. et al., 2001].

Олигомеризованные Bax и Bak способствуют выходу белков межмембранного митохондриального пространства в цитозоль [Tsujimoto Y., 1998; Adams J.M. 2003; Green D.R., Kroemer G., 2004; Elmore S. 2007] (рис. 2). Не все указанные протеины покидают митохондрии одновременно. В зависимости от изучаемой апоптотической модели цитохром c может определяться в цитоплазме перед или после AIF и Smac/Diablo. Полученные результаты объясняются различными механизмами выхода данных протеинов (например, специфических пор), а также механизмами удержания данных белков в межмитохондриальном пространстве. Так, цитохром c

высвобождается из связи с липидом внутренней мембраны митохондрий кардиолипином, при этом AIF расщепляется протеазами для удаления его заякоряющей части во внутренней митохондриальной мембране [Orrenius S., Zhivotovsky B., 2005; Polster B.M. et al., 2005]. С использованием видеомикроскопии было показано, что выход цитохрома *c* и AIF происходит быстро и скоординированно в течение пяти минут после проапоптотического стимула [Loeffler M. et al., 2001].

В дальнейшем соединение цитозольной прокаспазы-9, АТФ, Araf-1 и цитохрома *c* приводит к образованию массивного комплекса - апоптосомы. N-терминальный участок Araf-1 и прокаспазы-9 имеют комплементарные CARD домены, которые взаимодействуют между собой в отношении 1:1 [Fan T.J. et al., 2001; Arnoult D. et al., 2003]. В настоящее время известны 3 изоформы Araf-1, являющиеся результатом альтернативного сплайсинга пре-мРНК Araf-1. Данный белок имеет три домена: N-терминальный CARD, нуклеотид-связывающий домен и 12-13 повторов WD40 возле С-конца. CARD отвечает за связывание с продоменом прокаспазы-9. Последовательность нуклеотид-связывающего домена имеет высокое сходство с CED-4 *C. Elegans* и потому часто носит название CED-4 гомологичного домена. Данный участок ответственен за олигомеризацию Araf-1 в присутствии цитохрома *c* и АТФ. При этом способность связывать АТФ у Araf-1 резко возрастает при наличии цитохрома *c* [Jiang X., Wang X., 2000]. Активированная каспаза-9 индуцирует прокаспазу-3 и -7. Каспаза-3 также способна активировать каспазу-9 по принципу положительной обратной связи (рис.3).

Каспаза-3 является ключевым исполнителем апоптотической программы и представляет собой активную форму прокаспазы-3. Последняя может быть активирована каспазами-3, -8, -9, -10, CPP32 активирующей протеазой, гранзимом В (GranB) и другими молекулами. Мишенями индуцированной каспазы-3 являются прокаспазы-3, -6 и -9, ДНК-РК, РКСγ, PARP, D4-GDI (D4 GDP-диссоциированный ингибитор), белок, связанный со

стероидным ответом, U₁-70kD, ингибитор активированной каспазами деоксирибонуклеазы (ICAD) и др. Все субстраты, кроме α -фодрина и топоизомеразы I, расщепляются при апоптозе в каспаза-3-дефицитных клетках, что свидетельствует о том, что данный фермент является не единственным эффектором суицидальной программы [Yuan C.Q., Ding Z.H., 2002].

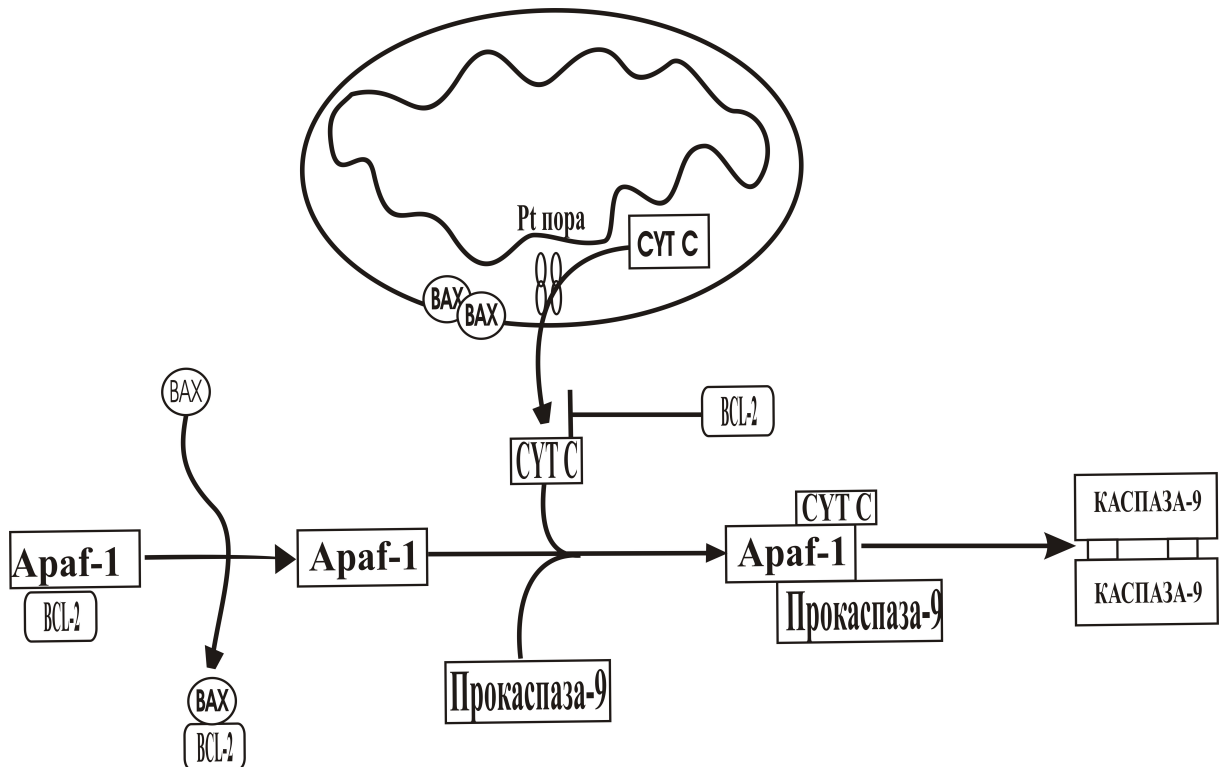


Рис. 2 Участие белков семейства Bcl-2 в регуляции проницаемости митохондриальной мембраны [по данным Y.Tsujimoto, 1998]

Активация и инактивация каспаз регулируется рядом протеинов, ионов и других факторов, таких как IAP, семейство белков Bcl-2, кальпаин, Ca²⁺, Gran B и CrmA.

Группа белков IAP была впервые идентифицирована в клетках насекомых, инфицированных бакуловирусом, где IAP ингибировали апоптоз клеток хозяина. В настоящее время у человека идентифицированы следующие члены семейства IAP: cIAP1, cIAP2, XIAP (X-ассоциированный протеин-ингибитор апоптоза млекопитающих), NAIP (нейрональный протеин-ингибитор апоптоза), survivin и livin. Все члены данного семейства

протеинов содержат 1-3 N-терминальный бакуловирусный IAP повтор (BIR домен) и один консервативный C-терминальный (RING домен).

BIR домены обладают структурой, способной к хелатированию ионов цинка. Данная структура может связываться с каспазами, блокируя каталитические центры каспаз. В результате IAP защищают клетку от апоптоза, ингибируя активность каспаз. RING домены обладают активностью убиквитин лигазы E3, которая катализирует взаимодействие между убиквитином и RING доменом или другими протеинами. Подобным образом RING домены могут вызывать деградацию каспаз, связанных с IAP [Huang Y. et al., 2001; Mace P. et al., 2009].

К ингибиторам каспаз относится белок xIAP из семейства IAP (inhibitors of apoptosis), который способен наиболее эффективно (среди других IAP-белков) ингибировать апоптоз, связываясь только с активными формами каспаз-3, -7 и -9, но не с их зимогенными проформами [Tenev T. et al., 2005]. Известно, что белок xIAP содержит три специфические последовательности BIR (baculoviral IAP repeat). Для реализации антиапоптотического действия указанного протеина требуется сохранение, по крайней мере, одного из участков BIR. Со стороны COOH-конца молекулы белка xIAP обнаружен домен RING, наличие которого для подавления апоптотического сигнала в большинстве типов клеток не обязательно. Доказано, что белок xIAP сохраняет свою антиапоптотическую функцию в отсутствие домена RING [Vaux D.L., Silke J., 2005].

Установлено, что для связывания xIAP с эффекторными каспазами-3 и -7 необходимо наличие BIR2-домена в структуре данного белка. BIR-2 домен ингибирует активность каспазы-3 путем отщепления каспазы от ее субстратов [Tenev T. et al., 2005]. При Fas-индуцированном апоптозе xIAP не связывает каспазу-8, а подавляет активность каспазы-3. При данном варианте запуска программированной гибели важную роль играет повышенная экспрессия BIR1-2 доменов [Tsuchiya Y., 2005]. Показано, что xIAP участвует в связывании каспаз при реализации митохондриального пути апоптоза. Для

ингибирования инициаторной каспазы-9 требуется наличие в белке xIAP домена BIR3.

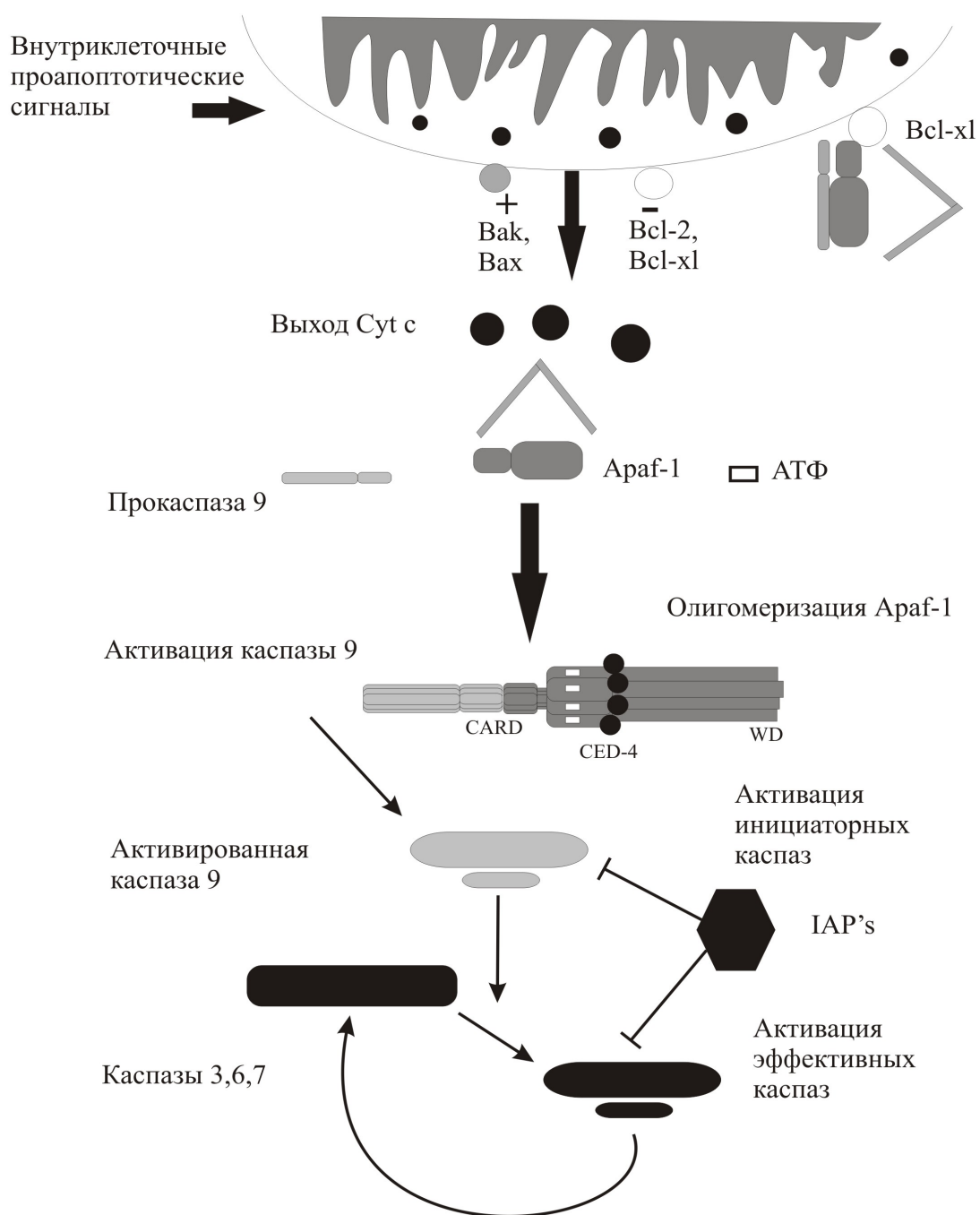


Рис.3 Митохондриальный путь активации каспаз [по данным T.J. Fan et al., 2001; D. Arnoult et al., 2003]

Посредством связывания гетеродимера BIR-3 домена с мономерной формой каспазы-9 не происходит димеризации и активации каспазы-9 [Shiozaki E.N., 2003]. xIAP препятствует также образованию апоптосомы с

прокаспазой-9 и Araf-1 и предотвращает активацию каспазы-3 [Salvesen G.S., Duckett C.S., 2002].

К ингибиторам каспаз относится также белок AVEN. Данный белок является антиапоптотическим белком семейства Bcl-2, он регулирует активность цистеиновых протеиназ, антиапоптотического протеина Bcl-xL и Araf-1. Действие белка AVEN связано с его способностью потенцировать антиапоптотическую активность Bcl-xL и ингибировать проапоптотическое действие Araf-1. Кроме того, показано, что протеин AVEN уменьшает протеолитическую активацию каспаз и препятствует соединению каспазы-9 с Araf-1 [Chau B.N., 2002].

Таким образом, реализация апоптоза представляет собой сложный поэтапный процесс, приводящий к активации основных эффекторных молекул – каспаз. Изменения, приводящие к дизрегуляции апоптоза, могут происходить на этапе инициации программированной клеточной гибели. В данном случае может нарушаться баланс между про- и антиапоптотическими белками-регуляторами проницаемости митохондриальных мембран, изменяться экспрессия рецепторов смерти и соответствующих лигандов. Описанные события будут сопровождаться дефектами активации инициаторных каспаз. Дизрегуляция апоптоза может иметь место также на уровне функционирования эффекторных ферментов в результате дисбаланса внутриклеточного содержания белков-ингибиторов каспазной активности.

1.2.2 Молекулярные механизмы регуляции клеточного цикла

Деление клеток состоит из двух основных событий, характеризующихся репликацией ДНК и разделением реплицированных хромосом на две отдельные клетки. Изначально в делении клетки выделяли только следующие фазы: митоз (М), то есть процесс деления ядра, и интерфазу, разделяющую последовательные стадии митоза. Стадии митоза включают профазу, метафазу, анафазу и телофазу. Репликация ДНК

происходит в S-фазу интерфазы. S-фазе предшествует фаза G_1 , в течение которой клетки подготавливаются к синтезу ДНК. После S-фазы следует G_2 стадия, в которой клетки подготавливаются к митозу. В течение G_1 -фазы клетки перед репликацией ДНК могут остановиться в G_0 -фазе клеточного цикла. Клетки в G_0 -фазе составляют основную массу в нерастущих и в непролиферирующих тканях. Многочисленные данные литературы свидетельствуют о том, что выбор клеткой пути дифференцировки, пролиферации, апоптоза и старения определяется в течение G_1 -фазы клеточного цикла. Одним из ключевых различий между соматической и эмбриональной клеткой является длительность G_1 -фазы, во время которой клетка подготавливается к S-фазе [Massague J., 2004; Neganova I., Lako M., 2008].

Прогрессия клеточного цикла эукариотических клеток регулируется за счет циклин-зависимых киназ (Cdks). В настоящее время идентифицированы девять Cdk, пять из них активируются во время прогрессии клеточного цикла: во время G_1 -фазы (Cdk4, Cdk6 и Cdk2), S (Cdk2), G_2 и M (Cdk1). Cdk7 функционирует в комплексе с циклином H и играет роль Cdk активирующей киназы (CAK). Содержание Cdk всегда остается на одном уровне в течение клеточного цикла. Уровень циклинов повышается и снижается при прогрессии клеточного цикла, что позволяет данным протеинам активировать Cdk в строго определенном порядке [John P.C. et al., 2001]. Различные циклины необходимы в определенные фазы клеточного цикла. Циклины D типа (циклин D1, D2 и D3) связываются с Cdk4 и/или Cdk6. Образование комплекса Cdk/циклин D типа необходимо для прогрессии G_1 -фазы клеточного цикла. В отличие от других циклинов, синтезируемых только в определенную фазу клеточного цикла, циклин D1 экспрессируется постоянно в присутствии митогенного стимула. К другим циклинам G_1 -фазы относится циклин E, который взаимодействует с Cdk2 и регулирует переход G_1 -S. Циклин A связывается с Cdk2 и этот комплекс необходим в прогрессии S-фазы. В поздней G_2 -фазе и начале M комплекс циклина A с Cdk1

способствует запуску митоза. В дальнейшем М-фаза регулируется комплексом циклина В и Cdk1. В настоящее время идентифицированы 16 циклинов, однако многие из них не участвуют в регуляции клеточного цикла. Циклины А и В содержат участок деструкции, а в структуру циклинов D и E входит PEST последовательность (сегмент, богатый пролином (P), глутаминовой кислотой (E), серином (S) и треонином (T)) – данный участок отвечает за эффективный убиквитин-ассоциированный циклиновый протеолиз в конце каждой фазы клеточного цикла [Uhlmann F. et al., 2011].

Помимо связывания с циклинами, активность Cdk также регулируется фосфорилированием консервативных треониновых и тирозиновых остатков. Так, для полной активации Cdk1 требуется фосфорилирование треонина 161 (треонина 172 у Cdk4, треонина 160 Cdk2), осуществляемое комплексом Cdk7-циклин Н, получившего название САК. Указанное фосфорилирование индуцирует конформационные изменения и увеличивает связывающую активность циклинов. Wee1 и Myt1 киназы фосфорилируют Cdk1 по тирозину-15 и/или треонину-14, вызывая таким образом инактивирование этой киназы. Дефосфорилирование по указанным сайтам ферментом CDC25 необходимо для активации Cdk1 и дальнейшей прогрессии клеточного цикла [Leise W., Mueller P.R., 2002; Lavecchia A., Giovanni C.D., 2012].

Циклин-зависимые киназы могут быть инактивированы протеинами, названными Cdk-ингибиторами (CKI), которые связываются с Cdk или с комплексами циклин-cdk [Millard S.S., Koff A., 1998; Lee Y.S. et al., 2007]. В настоящее время известны две крупные группы белков-ингибиторов: семейство белков INK4 и Cip/Kip-семейство. Группа INK4 включает p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18(INK4c) и p19 (INK4d), которые специфически инактивируют циклин-зависимые киназы G₁-фазы (Cdk4 и Cdk6). Данные CKI формируют стойкий комплекс с Cdk до их связывания с циклинами, тем самым предотвращая ассоциацию ферментов с циклинами D типа. Второе семейство ингибиторов Cip/Kip включает p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2), p57 (Kip2) и др. Эти ингибиторы инактивируют комплексы Cdk-циклин G₁-фазы

клеточного цикла, а также комплекс Cdk1-циклин В [Harper J.W., 1997; De Clercq A., Inzé D.Crit., 2006]. P21 также ингибирует синтез ДНК за счет связывания и ингибирования ядерного антигена (PCNA) пролиферирующих клеток. Активность СКІ регулируется как за счет внутренних, так и за счет внешних сигналов. Так, экспрессия p21 находится под транскрипционным контролем опухолевого супрессора p53. Промотор гена p21 содержит p53-связывающий сайт, который позволяет p53 транскрипционно активировать p21 ген [Gartel A.L., 2009]. Экспрессия и активация p15 и p27 увеличиваются в ответ на трансформирующий фактор роста β (TGF- β), вовлеченный в арест деления [Chen Z. et al., 2006].

Помимо описанных выше механизмов, регулирующих активность всех циклин-зависимых киназ, некоторые Cdkс могут зависеть от ряда дополнительных факторов. Так, Cdk1-циклин В могут быть активированы серин/треониновой киназой AuroraA и киназой Plk1. AuroraA при связывании с протеинами-партнерами Ajuba и Bora промотирует активность комплекса Cdk1-циклин В за счет фосфорилирования и активации Cdc25B [Dutertre S. et al., 2004]. Plk1 активирует Cdk1-циклин В за счет фосфорилирования и активации циклина В, а также за счет фосфорилирования и инактивации Myt1 [Inoue D., SagataN., 2005].

После активации Cdk фосфорилируют протеины-мишени, что приводит к дальнейшей прогрессии клеточного цикла. Наиболее изученным субстратом активации комплекса Cdk4/6-циклин D является продукт гена супрессора опухолей (pRb). Ген ретинобластомы локализован на 13q14.2 хромосоме и включает 27 экзонов, занимающих 180 kb хромосомы 13. Ген продуцирует транскрипт длиной 4,7 kb, кодирующий 928 аминокислот с молекулярной массой 110 kDa. Данный продукт 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].

Арест клеточного цикла осуществляется за счет взаимодействия Rb белка с протеинами-мишенями семейства E2F транскрипционных факторов. Циклин-зависимые киназы в комплексе с циклинами инактивируют белок ретинобластомы путем фосфорилирования, что является необходимым событием перехода G1-S фаз [Wong S., Weber J.D., 2007]. Фосфорилирование комплексами циклин D-Cdk4/Cdk6 и циклин E-Cdk2 необходимо для полной инактивации Rb и прогрессии клеточного цикла. Оба циклина и соответствующие циклин-зависимые киназы активируются в поздней G₁-фазе и фосфорилируют Rb по специфическим аминокислотным остаткам [Garnovskaya M.N. et al., 2004].

По мере прогрессии клеточного цикла осуществляется проверка правильности его событий в нескольких точках, получивших название «сверочных точек» (checkpoint) [Kasten M., Bartek J., 2004]. Эти точки расположены в концах G₁-, G₂- и M-фаз. В первой точке осуществляется проверка наличия повреждений ДНК, во второй, - наряду с повреждениями ДНК, проверяется завершенность репликации, в третьей – тестируется правильность расхождения хромосом в митозе. «Сверочная точка», реализуемая в G₁ фазе клеточного цикла, включает сигнальный каскад PI3 киназ ATM и ATR, а также эффекторных киназ «сверочных точек» Chk1 и Chk2 [Sancar A. et al., 2004]. Данные эффекторные киназы предотвращают прогрессию клеточного цикла за счет фосфорилирования и модификации активности субстратов, вовлеченных в регуляцию функционирования комплексов циклины-циклин-зависимые киназы, включая Cdc25. Аналогичная сверочная точка представлена в G₂-фазе и необходима для проверки интактности ДНК и оценки завершенности репликации до вступления в митоз. Если обнаруживается какое-либо из вышеперечисленных нарушений, то происходит остановка клеточного цикла, что дает время для их исправления. Если исправление оказывается невозможным, то происходит запуск механизма апоптоза – программируемой клеточной смерти [Dai Y., Grant S., 2010].

Таким образом, прогрессия фаз клеточного цикла представляет собой хорошо скоординированный, поэтапный и высокорегулируемый процесс. Оценка механизмов, задействованных в специфической регуляции продолжительности фаз клеточного цикла и независящих от активации его «сверочных точек» может привести к созданию специфических подходов к управлению пролиферацией.

1.2.3 Регуляторные молекулы апоптоза и пролиферации клеток

1.2.3.1 p38 митоген-активируемая протеинкиназа

Митоген-активируемые протеинкиназы являются семейством белков, задействованным в трансдукции внутриклеточного сигнала и вовлеченном в процессы, контролирующие экспрессию генов, деление клеток, апоптоз, метаболизм и дифференцировку. Семейство MAPK может быть разделено на две подгруппы: классические и атипичные митоген-активируемые киназы. Члены первой группы конвертируют сигнал за счет цепочки последовательных фосфорилирований MAPK киназ киназ, MAPK киназ и MAPK. Атипичные MAPK не организованы в трех-ступенчатый каскад. К группе классических MAPK относят: 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-терминальные киназы 1-3 (JNK 1-3), p38MAPK и большую MAPK (BMK/ERK5). Атипичные MAPK включают ERK 3/4, ERK 7/8 и немоподобную киназу (NLK). Как классические, так и атипичные MAPK фосфорилируют непротеин-киназные субстраты или другие протеинкиназы, обозначенные как MAPK-активированные протеин киназы (MAPKAPKs). Были идентифицированы 11 человеческих MAPKAPKs, основными мишенями которых являются транскрипционные факторы [Kostenko S. et al., 2011].

К стресс-активируемым киназам семейства MAPK относятся JNK, p38 и ERK1/2. Активаторами p38 MAPK являются цитокины, АФК, ультрафиолетовое излучение, ингибиторы синтеза белка и другие стрессовые

воздействия [Gallo K.A., 2002; Corre S. et al., 2004; Beere H.M., 2005; Teraishi F., 2005; Шемарова И.В., 2006].

p38 MAPK является стресс активируемой киназой, поскольку ее индукция происходит в результате воздействия на клетку различных стрессовых сигналов, приводящих к гибели. Данный факт лег в основу утверждения о том, что p38 опосредует клеточную смерть. Указанное предположение верно в большинстве случаев, однако установлено, что в некоторых условиях p38 ответственна за выживание клеток. Необходимо идентифицировать молекулярные механизмы, которые в одних случаях приводят к смерти, а в других - способствуют промоции пролиферации за счет активации p38 MAPK.

1.2.3.2 Транскрипционный фактор p53

P53 является транскрипционным фактором, активирующимся в ответ на различные формы клеточного стресса, и необходимым для регуляции гомеостаза клеток. К факторам, вызывающим индукцию p53, относят повреждение ДНК, гипоксию, а также сбившуюся экспрессию онкогенов. Следствием запуска транскрипционного фактора p53 может быть репарация ДНК, клеточное старение и апоптоз. Нарушения функции p53 приводят к генетической нестабильности, клеточному бессмертию, что позволяет выживать и эволюционировать поврежденным клеткам [Krasikova M. et al., 2013].

Поскольку характер клеточного ответа при активации p53 варьирует от замедления клеточного цикла до гибели, был предложен ряд гипотез, объясняющих исход индукции данного белка. Установлено, что судьба клетки после запуска p53 зависит от:

- 1) типа клеток и тканей [Schuller S., Green D., 2001];
- 2) характера, амплитуды и продолжительности стрессового стимула [Zhao R. et al., 2000];
- 3) уровня экспрессии p53 [Zhao R. et al., 2000];

- 4) состояния других внутриклеточных сигнальных систем [Seoane J. et al., 2002];
- 5) посттрансляционной модификации p53 [Oda K. et al., 2000].

Транскрипционный фактор p53 изменяет клеточную жизнедеятельность, благодаря своей способности трансаktivировать и трансрепрессировать гены. К числу генетических мишеней p53 относят Bax, Puma, Noxa, Bid, Fas/CD95, FasL, TNFSF6, p21, Survivin и др. [Kho P.S. et al., 2004; Riley T. et al., 2008]. Активация клеточной гибели с участием p53 может происходить и через транскрипционно независимые механизмы. Так, повышенная экспрессия p53-мутантных протеинов приводит к их аккумуляции на уровне митохондрий и нарушению функционирования данных органелл с последующей индукцией апоптоза [Moll U.M. et al., 2005].

Таким образом, активация p53 коренным образом изменяет жизнедеятельность клетки и имеет широкий диапазон эффектов: от замедления ее деления до гибели.

1.3 Роль газотрансмиттеров в регуляции апоптоза и клеточного цикла

1.3.1 Физиологические мишени действия газов в регуляции апоптоза и клеточного цикла

Газы NO, CO и H₂S на протяжении долгого времени были известны своими цитотоксическими свойствами. Данные вещества в высоких концентрациях ингибируют терминальный акцептор электронов электронной транспортной цепи COX, вызывая гибель клеток от энергетического коллапса [Kajimura M. et al., 2010]. Миллимолярные и высокие микромолярные количества газовых посредников обладают проапоптотическим эффектом за счет нарушения функционирования митохондрий. Низкие микромолярные концентрации газов могут оказывать как про-, так и антиапоптотическое действие в зависимости от типа клеток [Wang R., 2003; Yang G. et al., 2004; Wu L., Wang R., 2005; Pacher P. et al., 2007]. В последние годы интерес исследователей сосредоточен на изучении роли физиологических

концентраций газовых мессенджеров в регуляции программированной гибели клеток. Проапоптотические свойства оксида азота были продемонстрированы для таких клеточных линий, как эпителиальные, эндотелиальные и мезангиальные клетки. Индукция NO-синтазы ассоциирована с гибелью макрофагов в области ишемии миокарда, вызванного в сердце кролика перевязкой левой передней нисходящей артерии [Зенков Н.К. и соавт., 2001; Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006].

В нашей лаборатории ранее было продемонстрировано, что оксид азота отменяет апоптоз нейтрофилов при окислительном стрессе *in vitro* и при воспалении [Степовая Е.А. и др., 2008]. Ингибирование апоптоза нейтрофилов имеет высокую физиологическую значимость при развитии воспалительной реакции, способствуя эффективной элиминации патогена. Устойчивость к воздействию Fas-лиганда эозинофильных лейкоцитов, часто наблюдаемая при аллергических заболеваниях, может быть связана с повышением концентрации NO. Антиапоптотическое действие NO также установлено в условиях TNF-, Fas- и липополисахарид-индуцированного апоптоза в большинстве клеточных систем [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006]. Одним из механизмов антиапоптотического действия оксида азота может служить ингибирующее нитрозилирование эффекторных молекул апоптоза – каспаз [Török N.J. et al., 2002; Maejima Y., 2005].

Высокие дозы оксида азота оказывают цитотоксическое влияние на все клетки организма млекопитающих, однако гибель клеток в этом случае происходит не только по пути апоптоза, но и с участием некротического пути [Kajimura M. et al., 2010].

Нетоксические концентрации монооксида углерода могут опосредовать свой эффект на клеточную жизнедеятельность за счет индукции окислительного стресса. Было показано, что экзогенный CO (10 мкМ CORM-2) ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток воздухоносных путей за счет увеличения продукции АФК в митохондриях [Taille C., 2005]. CO увеличивает также экспрессию SOD-2, которая нивелирует повышение

содержания супероксид аниона и, следовательно, увеличивает генерацию перекиси водорода в митохондриях [Desmard M. et al., 2007]. Исследования, предполагающие воздействие газообразного СО на клетки и ткани, выявили антиапоптотический потенциал монооксида углерода. Экзогенный СО или генерируемый при суперэкспрессии HO-1 предохраняет β -клетки поджелудочной железы, фибробласты и эндотелиальные клетки от TNF-индуцированного апоптоза. Данный эффект является p38 MAPK зависимым (рис.4) [Inguaggiato P. et al., 2001].

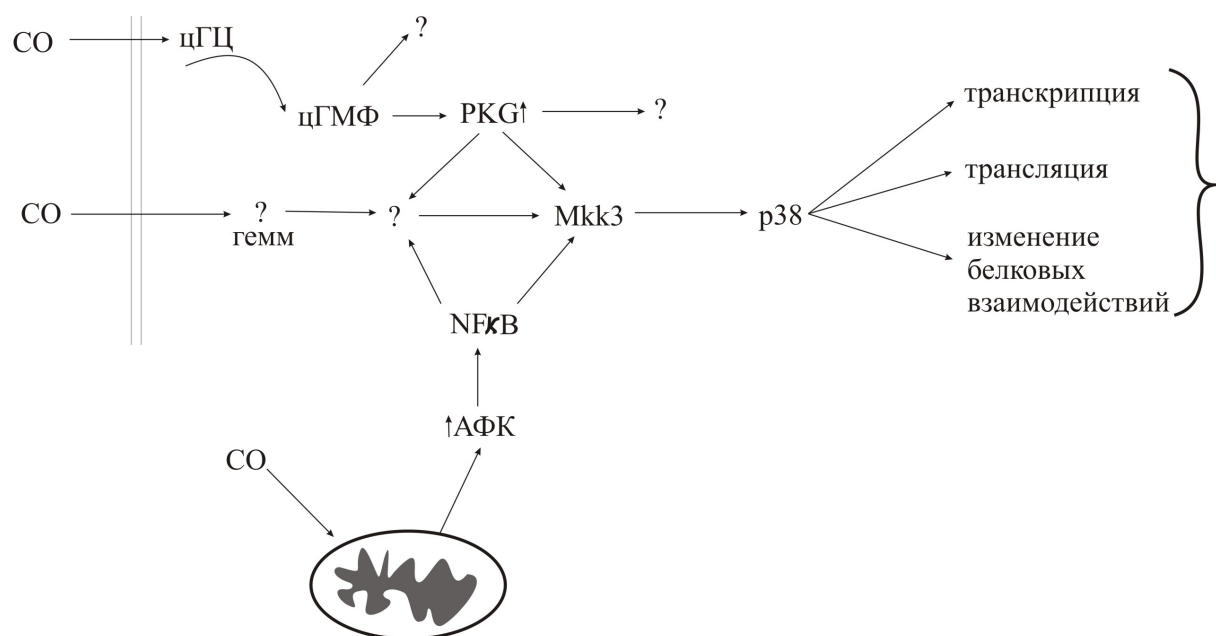


Рис.4 Участие монооксида углерода во внутриклеточной сигнальной трансдукции [по данным P. Inguaggiato et al., 2001]

Сульфид водорода индуцирует пролиферацию легочных и эндотелиальных клеток, миоцитов сердца, клеток пупочной вены, а также активирует апоптоз гладкомышечных клеток, легочных фибробластов и клеток перидонтальной связки [Basker R., Bian J., 2011]. Сульфид водорода регулирует клеточную гибель, возможно, за счет способности активировать калиевые АТФ-чувствительные каналы, ингибирования активации NF-kB и p38MAPK, повышения содержания внутриклеточного цАМФ и ингибирования расщепления каспазы-3 [Tang G. et al, 2010].

Сульфид водорода снижает содержание таких провоспалительных цитокинов как TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-8 [Elrod J.W. et al, 2007; Pan L.L. et al., 2011; Kloesch B. et al., 2012], изменяет адгезию лейкоцитов [Sodha N.R. et al., 2009], опосредует кардиопротективный эффект [Yong Q.C. et al., 2008] и защищает клетки от TNF-опосредованного эндотоксического шока [Li L. et al., 2009]. Мощные восстановительные/антиоксидантные свойства сульфида водорода объясняют его противовоспалительный и цитопротекторный потенциал, включая защиту от ишемически-реперфузионных повреждений клеток сердца, мозга, сетчатки, печени, кишечника, эндотелиальной дисфункции, повреждения эпителиальных клеток кишечника крыс, опосредованного перекисью водорода, гипергомоцистеинемии крыс, метионин- и гомоцистеин-индуцированного окислительного стресса [Li L. et al., 2011].

Таким образом, NO может обладать как про-, так и антиапоптотическими свойствами в отношении «здоровых» клеток организма. В целом, показано протективное влияние монооксида углерода и сульфида водорода в отношении различных типов клеток.

1.3.2 Роль газотрансмиттеров в дизрегуляции апоптоза и пролиферации опухолевых клеток

Поскольку газы способны оказывать модулирующее действие на процессы реализации апоптоза и пролиферации клеток, интерес исследователей в настоящее время сосредоточен на возможности управления указанными процессами с помощью газотрансмиттеров при опухолевом перерождении клеток. Оксид азота может повреждать ДНК и защищать от цитотоксических агентов, способен ингибировать и стимулировать пролиферацию клеток, а также оказывать как про-, так и антиапоптотический эффект. Исследования последних лет продемонстрировали ассоциацию индуцибельной NO синтазы с некоторыми злокачественными новообразованиями, включая опухоли молочной железы, мозга, легких,

простаты, карциномой поджелудочной железы, саркомой Капоши и меланомой [Singh S., Gupta A.K., 2011]. В опухолях женской половой системы было показано, что экспрессия NO повышена в малегнизированных клетках и отсутствует в окружающих «здоровых» тканях. Полученные данные позволили предположить взаимосвязь между активностью iNOS и опухолевым ростом. При исследованиях неопластических заболеваний центральной нервной системы была установлена корреляция между экспрессией iNOS и ростом новообразований [Lim K.H. et al., 2008]. Клинические данные показали, что при меланоме пациенты с высоким уровнем экспрессии iNOS имеют низкие показатели выживаемости по сравнению с iNOS-негативными пациентами [Ridnour L.A. et al., 2006].

Однако при исследовании метастазов в лимфатических узлах у пациентов с меланомой было показано, что низкая экспрессия iNOS опухолевыми клетками ассоциирована с риском образования дистантных метастазов [Le X. et al., 2005]. Оксид азота обладает антипролиферативным действием в отношении клеток солидных опухолей, а также прекурсоров нервных клеток [Yasuda H., 2008; Реña-Altamira E. et al., 2010]. Доноры NO DETA/NO и нитроглицерин снижали резистентность к доксорубину на 33-50% в культуре клеток карциномы человека. Во второй фазе клинических исследований H. Yashuda et al. [2006] изучали эффективность и безопасность нитроглицерина в сочетании с винорелбином и циплатином. В исследование были включены 120 пациентов с нелеченным немелкоклеточным раком легких в IIIB/IV стадии. Было показано, что включение нитроглицерина в схему проводимой терапии улучшало ответ на лечение и выживаемость пациентов без значительных побочных эффектов. Полученные данные наводят на мысль о возможности использования оксида азота в качестве сенсibiliзирующего агента, при этом комбинация лечения донорами NO и химиотерапевтическими агентами может приводить к синергитической активности при терапии рака.

Полученная дихотомия в результатах проведенных исследований может быть результатом различий в уровне продуцируемого NO, вариабельности профиля про- и антиапоптотических генов, а также присутствием других реактивных молекул [Singh S., Gupta A.K., 2011].

Одними из критических звеньев обусловленной NO регуляции являются транскрипционные факторы HIF-1 и p53, изменения функционирования которых приводит к аресту деления, апоптозу или адаптации [Engin A.B., 2011]. Было показано, что оксид азота сенсibiliзирует клетки рака яичника и аденомы простаты к TNF-индуцированному апоптозу за счет ингибирования NF-kB-зависимой экспрессии [Huerta-Yepez S. et al., 2004]. Установлено участие NO в регуляции экспрессии Fas-рецептора при сенсibiliзации оксидом азота клеток рака яичников к Fas-индуцированному апоптозу [Garbán H.J, Bonavida B., 1999]. Было показано также, что оксид азота индуцирует экспрессию Fas-антигена через цГМФ-независимые механизмы в гладких мышцах [Fukuo K. et al., 1996] и праймирует β -клетки поджелудочной железы к Fas-индуцированному апоптозу [Stassi G. et al., 1997]. Доноры NO сенсibiliзируют раковые клетки к химиотерапевтическим агентам за счет нитрозилирования тиолов в молекуле ДНК в клетках гепатомы. Другие исследования показали повышение чувствительности к терапии циплатином и мелфаланом донорами NO в различных клеточных линиях. Полученные данные являются результатом модификации за счет оксида азота ключевых биологических мишеней, включая протеины, ответственные за репарацию ДНК и транскрипционные факторы [Singh S., Gupta A.K., 2011].

Протективные свойства гем-оксигеназы-1 изначально продемонстрированные при кардиоваскулярных и почечных заболеваниях, могут быть вовлечены в процесс канцерогенеза. Большое число исследований показывает, что HO-1 может модулировать процесс инициации опухолевого роста и метастазирования [Was H. et al., 2010]. Активность данного фермента повышена в опухолевых тканях поджелудочной железы,

глибластом, гепатом, аденокарцином, меланом и рака простаты [Ollinger R. et al., 2005; Kim J.Y. et al., 2009].

В пределах опухоли HO-1 может быть локализована в инфильтрирующих лейкоцитах (особенно макрофагах) и/или в опухолевых клетках. Экспрессия фермента возрастает в ответ на проводимую терапию, что приводит к развитию окислительного стресса [Lin Q. et al., 2007].

Одной из специфических мишеней СО-опосредованной регуляции апоптоза является транскрипционный фактор HIF1. Экспрессия последнего возрастает под влиянием СО, что позволяет предполагать наличие положительной обратной связи СО – HIF-1 – HO1 – СО [Wegiel C. et al., 2008]. HIF1 является транскрипционным фактором, регулирующим экспрессию антиапоптотических белков, что может являться одним из механизмов антисуицидального действия монооксида углерода. В экспериментах на изолированных митохондриях было продемонстрировано, что СО препятствует деполяризации и пермеабиллизации митохондриальных мембран, предотвращая выход в цитозоль апоптоз-индуцирующих факторов [Queiroga C.S. et al., 2011]. Однако в экспериментах с использованием Jurkat клеток было показано, что СО усиливает клеточную смерть, активированную Fas/FasL или TRAIL лигандами [Song et al., 2004].

Сульфид водорода может играть роль окислителя; кроме того, его высокая реакционная способность и как окислителя, и как восстановителя неорганических полисульфидов наводит на мысль о возможной роли сульфида водорода как прооксидантного агента, вовлеченного в индукцию гибели опухолевых клеток [Jacob C., 2008]. M.Chattopadhyay et. al. [2012] показали, что H₂S-высвобождающие нестероидные противовоспалительные агенты эффективно ингибируют рост 11-ти различных опухолевых клеточных линий за счет замедления пролиферации, индукции апоптоза и ареста G0/G1 фазы клеточного цикла. Воздействие на клетки различных типов NaHS и медленно высвобождающего H₂S донора GYY4137 показало,

что последний (но не NaHS) цитотоксичен для опухолевых клеток и не оказывает влияния на нормальные фибробласты легочной ткани [Lee Z.W. et al., 2011]. В исследованиях с использованием различных опухолевых линий было показано, что сульфид водорода способен ингибировать все стадии развития опухолей [Filomeni G. et al., 2003; Medeiros J.V. et al., 2009; Lee B.C., et al., 2011].

Однако экспрессия ферментов, синтезирующих сульфид водорода, повышена в различных типах опухолей [Renga B., 2011; Guo H. et al., 2012]. Поскольку активные формы кислорода являются важными посредниками в передаче сигнала в апоптозу и пролиферации, повышение продукции H_2S может являться защитно-приспособительной реакцией новообразований, направленной на поддержание редокс-гомеостаза и ускользания от проводимой терапии.

Таким образом, исследования трансдукции апоптотического сигнала с участием оксида азота позволили выявить NO-чувствительные мишени регуляции программированной гибели клеток. Влияние оксида азота на процессы реализации апоптоза обусловлены взаимодействием с гемом транскрипционных факторов и нитрозилированием активных центров ферментов. Вместе с тем, в настоящее время не определены специфические молекулярные механизмы действия сульфида водорода и монооксида углерода в системе передачи апоптотического сигнала. Представленные данные литературы позволяют предполагать наличие специфических мишеней регуляции апоптоза и пролиферации с участием газотрансмиттеров.

Заключение

Накопленные к настоящему времени данные экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что газы, химически модифицируя внутриклеточные мишени, влияют на многие аспекты жизнедеятельности клетки. Оксид азота способен, связываясь с гемом, модулировать активность транскрипционных факторов и ферментов. NO опосредует также свои

биологические эффекты за счет реакций нитрозилирования белков и изменения редокс-статуса клетки. Сульфид водорода, помимо мощных восстановительных свойств, обладает способностью сульфгидрировать белки и взаимодействовать с гем-содержащими ферментами. Монооксид углерода влияет на клеточный метаболизм за счет реагирования с гемом в активных центрах белков. Данные литературы убедительно свидетельствуют о том, что газовые посредники участвуют в регуляции апоптоза и пролиферации клеток.

Реализация апоптотической программы клеток определяется адекватным функционированием основных эффекторных молекул – каспаз. Запуск инициаторных членов данного семейства энзимов происходит в результате активации рецепторного и/или митохондриального путей индукции апоптоза. В литературе представлены многочисленные данные, свидетельствующие о том, что увеличение внутриклеточной концентрации газов приводит, в первую очередь, к изменению митохондриальной функции. Данный факт позволяет предполагать, что именно митохондриальный путь является превалирующим в регуляции апоптоза при действии внутриклеточных газовых трансммиттеров. При этом в литературе нет четкого ответа на вопрос, является ли индукция митохондриального пути следствием неспецифического воздействия или происходит в результате специфичного для каждого газа дисбаланса в системе белков Bcl-2. Последнему принадлежит ключевая роль в регуляции проницаемости митохондриальных мембран. В литературе также имеются данные о том, что газы могут влиять и на рецепторный путь апоптоза. Данный вариант инициации программированной гибели запускается при связывании лиганда с соответствующим рецептором на поверхности клеток. Активация митохондриального и рецепторного путей приводит к каталитическому расщеплению прокаспаз 8 и 9, соответственно, и образованию активных форм данных ферментов. Последние индуцируют эффекторную каспазу 3, опосредующую морфологические апоптотические изменения. Однако остановка клеточной гибели возможна даже на этапе функционирования

каспаз. Ее опосредуют белки-ингибиторы каспазной активности, к которым относятся белки XIAP и Aven. В настоящее время в литературе не представлены единые данные, описывающие влияние газов на данные протеины и их возможный вклад в регуляцию апоптоза при изменении внутриклеточной концентрации газотрансмиттеров (табл.1, рис. 5).

Контроль пролиферативной активности клеток осуществляется за счет изменения продолжительности фаз клеточного цикла. При этом G₁-фаза наиболее вариабельна по продолжительности. К основным регуляторным субъединицам, контролирующим длительность данного периода клеточного цикла, относят: циклин D1, циклин-зависимую киназу 4, pRb, белки-ингибиторы клеточного цикла, в том числе p53-зависимый протеин p21. Имеющиеся данные литературы не позволяют ответить на вопрос - являются ли ключевые элементы, регулирующие G₁-фазу клеточного цикла, мишенями оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода (табл.1, рис. 5).

Учитывая высокую химическую активность газотрансмиттеров, а также многообразие потенциальных мишеней их действия в системе апоптоз-пролиферация, для нас в рамках проводимого исследования представляется целесообразным выявить молекулярные механизмы действия газов для патогенетически обоснованной коррекции дизрегуляции указанных процессов при опухолевом перерождении клеток.

Характер клеточного ответа при воздействии газовых трансммиттеров оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода

Клеточный ответ	Воздействие оксида азота	Воздействие монооксида углерода	Воздействие сульфида водорода
Проапоптотический	Wang C.Y. et al., 1998; Fukuo K. et al., 1996; Stassi G. et al., 1997; Hongo S. et al., 2005; Lee M. et al., 2007; Hussain H.D. et al., 2003	Song X. et al., 2004; Lang E. et al., 2012; Winburn I.C. et al., 2012	Yang S. et al., 2004; Cao Y. et al., 2006; Adhikari S., Bhatia M., 2007
Антиапоптотический	De Nadai C. et al., 2000; Choi B.-M. et al., 2002; Степовая Е.А. и др., 2009	Moore B.A. et al., 2003; Otterbein L.E., 2002; Nakao A. et al., 2006	Kimura Y. et al., 2006; Kimura Y. et al., 2010; Kimura Y. and Kimura H., 2004; Whiteman M. et al., 2004; Whiteman M., 2005
Блок клеточного цикла	Hussain P. et al., 2003; Yasuda H., 2008; Peña-Altamira E., Petazzi P., 2010	Taille C., 2005	Chattopadhyay M. et al., 2012; Lee B.C., et al., 2011
Промоция клеточного цикла	Lala P.K., Chakraborty C., 2001	Jozkowicz A. et al., 2007	Basker R., Bian J., 2011

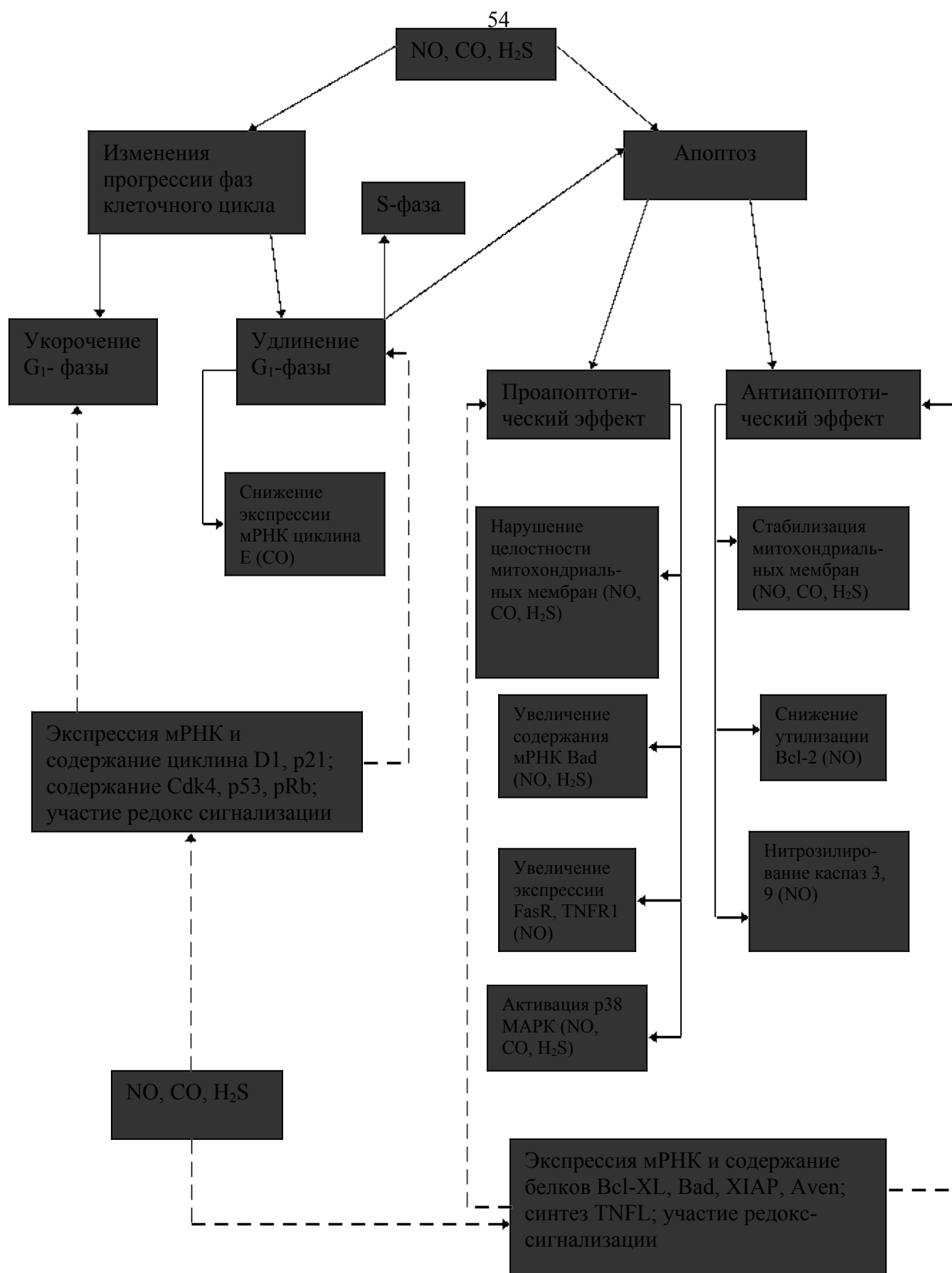


Рис.5 Молекулярные мишени действия газовых транмиттеров в регуляции апоптоза и пролиферации клеток [по данным Н. Kimura, 2004; М. Whiteman et al., 2004; Н. Yasuda 2008; Е. Lang et al., 2012]

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал 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 человек, женщины – 16 человек). Критериями включения лиц в группу здоровых доноров являлись: отсутствие острых и хронических инфекционных заболеваний, обострений хронических соматических заболеваний, а также злокачественных новообразований, психических расстройств, алкогольной и наркотической зависимости (заключение этического комитета СибГМУ №1183 от 01.03.2010).

Материалом для исследования служила венозная кровь, взятая утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл и стабилизированная K_3 ЭДТА.

2. Клетки линии Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия)

Данные клетки получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Указанная клеточная линия была создана в конце 1970-х гг. из крови 14-ти летнего больного Т-лимфобластной лейкемией. Клетки линии Jurkat являются иммортализованными Т-лимфоцитами человека, синтезирующими интерлейкин-2 и экспрессирующими Т-клеточный маркер CD3. Криоконсервация проводилась в ростовой среде, дополненной 10% DMSO, с плотностью $3,0-4,0 \times 10^6$ клеток/мл в криотубах с последующим определением жизнеспособности, равной 90% (окраска трипановым синим на нулевом пассаже). Способ культивирования линии – суспензионный в среде RPMI-1640, дополненной эмбриональной телячьей сывороткой (9:1), оптимальная плотность посева $3,0-9,0 \times 10^5$ клеток/мл. Сотрудниками Института цитологии РАН был проведен контроль контаминации на бактерии, грибы и микоплазмы в данной клеточной линии, а также контроль

видовой идентичности (кариологический и изоферментный (ЛДГ и Г6ФДГ) анализ). Кариология линии: $2n=46$, пределы изменчивости по числу хромосом - 41-49, модальное число хромосом - 46-47, количество полиплоидов - 2,0 %.

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

2.1.1 Экспериментальные модели исследования

Существует несколько подходов для изучения роли газовых мессенджеров в системе сигнальной трансдукции. Одним из них является моделирование экспрессии генов, ответственных за внутриклеточный синтез газов. Однако в результате реакций, катализируемых ферментами-мишенями генетических преобразований, образуются не только газовые трансммиттеры, но и другие биологически активные продукты. Так, в реакции с участием гем-оксигеназ генерируются оксид углерода, двухвалентное железо и биливердин [Alam J., Cook J.L. 2003]. Таким образом, усиление или ингибирование экспрессии гена гем-оксигеназы не позволяет получить четкий ответ на вопрос о роли оксида углерода в функционировании клеток. Другим подходом к изучению роли и места газовых трансммиттеров в системе внутриклеточной сигнальной трансдукции является использование специфических доноров NO, CO и H₂S. Для изучения функции NO в регуляции физиологических и патологических процессов наиболее часто используется нитропруссид натрия (рис.6). Данное соединение представляет собой растворимый в воде нитрозилированный комплекс железа, используемый в клинике как мощный вазодилататор при лечении гипертензии, а также широко применяемый в научных исследованиях для изучения цитотоксического влияния нитрозилирующего стресса [Tuteja M. et al., 2004]. Однако имеющиеся в составе SNP циано-группы могут вносить дополнительный модулирующий вклад в изучаемые процессы. Для четкого

разграничения специфических и неспецифических эффектов действия нитропруссид натрия нами был выбран часто применяемый в научных исследованиях подход к использованию различных по химической структуре доноров одного и того же вещества. В этих целях мы применяли донор оксида азота NOC-5 (3-(аминопропил)-1-гидрокси-3-изопропил-2-оксо-1-триазин) (рис.6). Показано сосудорасширяющее действие данного вещества, реализуемое за счет активации гуанилат-циклазы [Perez-Zoghbi J.F. et al., 2010].

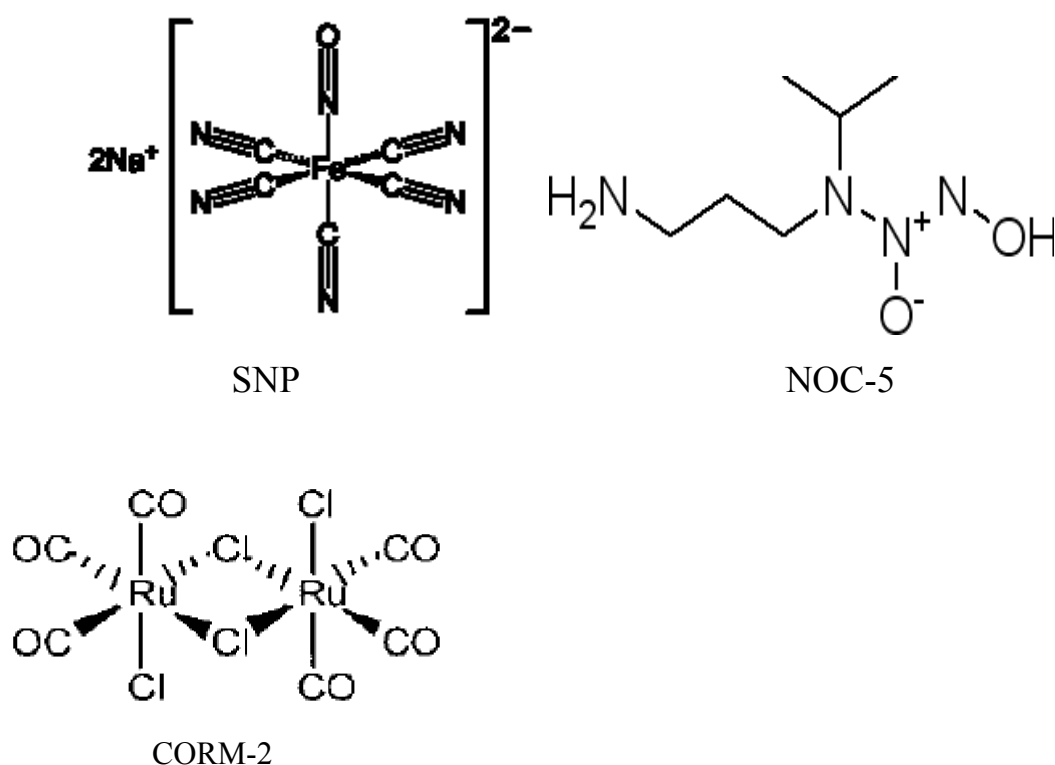


Рис. 6. Химическая структура специфических доноров газовых трансмиттеров оксида азота (SNP и NOC-5) и монооксида углерода (CORM-2)

Для моделирования молекулярных эффектов действия монооксида углерода клетки инкубировали с донором CO CORM-2 (CO-высвобождающая молекула). Основными свойствами CORM-2 ($\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2$ димер), выгодно отличающими его от других соединений группы CO-высвобождающих молекул, являются липофильность и способность быстро диссоциировать с образованием монооксида углерода [Hidaka A., 2010].

Следует отметить, что CORM-3 и CORM-4 являются водорастворимыми донорами CO и не способны проникать через мембрану клетки. CORM-1 ($[\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}]$) требует дополнительных стимулов для диссоциации в водном растворе.

Наиболее часто для определения роли сульфида водорода в функционировании клетки исследователи применяют натрий гидросульфид гидрат (NaHS), способный диссоциировать в водном растворе на ионы Na^+ и HS^- . Последний связывается с ионом водорода с формированием сульфида водорода, который, благодаря своим липофильным свойствам, легко проникает через клеточные мембраны [Lowiska E., Beltowski J., 2007].

2.2 Методы исследования

В соответствии с поставленными целью и задачами исследования нами были использованы три модели, необходимые для выяснения роли каждого газового трансммиттера (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. Оценивали характер клеточного ответа через 15 мин после воздействия доноров газотрансммиттеров, а также отсроченную реакцию через 24 ч.

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. 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 воздействия на клетки газовых трансммиттеров. Определяли p38 MAPK-зависимые и независимые мишени действия газов (рис.7, табл.2) .

2.2.1 Культивирование клеточной линии Jurkat

Т-лимфобластные клетки человека линии Jurkat культивировали в RPMI-1640 («Invitrogen», США), дополненной в соотношении 9:1 эмбриональной телячьей сывороткой («Gibco Invitrogen», США), 0,3 мг/мл L-глутамином и 100 мкг/мл гентамицином в 5% CO₂ атмосфере при 37°C, с оптимальной плотностью 1*10⁶ клеток/мл. 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.

Жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов оценивали по содержанию «мертвых» клеток, окрашенных в синий цвет. Доля погибших клеток, содержащих краситель, не превышала 5%.

2.2.2 Выделение и культивирование мононуклеарных лейкоцитов венозной крови

Мононуклеарные клетки выделяли из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования [Натвиг Дж. и соавт., 1980].

Таблица 2

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

Методы	Клеточные линии	Экспериментальные модели			
		Клетки, не подвержены 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 TNFα 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



Рис.7 Дизайн исследования

Венозную кровь, стабилизированную КЗЭДТА в соотношении 2:1, наслаивали на градиент плотности Ficoll-Paque ($\rho=1,077$ г/см³) («Pharmacia», Швеция) и центрифугировали при 900g в течение 20 мин. Кольцо, образованное из смеси моноклеарных лейкоцитов, собирали пипеткой с раздела фаз. Клетки трижды отмывали средой RPMI-1640, ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 900g.

Для определения жизнеспособности 7 мкл суспензии клеток смешивали с 70 мкл 0,5% трипанового синего («Serva», США) и 70 мкл 0,9% NaCl, заполняли счетную камеру Горяева. Жизнеспособность моноклеарных лейкоцитов оценивали по содержанию «мертвых» клеток, окрашенных в синий цвет. Доля погибших клеток, содержащих краситель, не превышала 5 %.

Выделенные на градиенте плотности моноклеарные лейкоциты ресуспендировали в полной питательной среде (90% RPMI-1640, 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco Invitrogen», США), 0,3 мг/мл L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина). Для стандартизации количества клеток суспензию моноклеарных лейкоцитов разбавляли полной питательной средой до получения $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл среды.

2.2.3 Культивирование клеток в условиях воздействия доноров газотрансмиттеров и ингибирования р38 MAPK-зависимых механизмов их действия

Для определения влияния газов на процессы реализации апоптоза и пролиферации клеток клеточную линию Jurkat и выделенные моноклеарные лейкоциты крови культивировали в стерильных 96-луночных круглодонных иммунологических планшетах. В лунки планшетов вносили суспензию клеток и добавляли доноры исследуемых газовых трансммиттеров. 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 трансммиттеров SNP и

NaHS 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. Для подтверждения ведущей роли CO в полученных изменениях использовали не содержащую монооксид углерода CORM-2 (iCORM-2). Для этого готовили водный раствор CORM-2 необходимой молярности и выдерживали в течение суток для выведения CO из раствора [Zhao S. et al., 2014].

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

2.2.4 Оценка реализации апоптоза клеток

Для оценки реализации апоптоза мононуклеарных лейкоцитов и клеток линии Jurkat использовали FITC-меченный аннексин V, обладающий сродством к мембранно-связанному фосфатидилсерину [Van Engeland M., 1998].

Исследование осуществляли с помощью набора реагентов «ANNEXIN V FITC» («Abcam», США). В чистую полистириновую пробирку помещали 200 мкл суспензии клеток ($2,0 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл) и промывали охлажденным на льду фосфатно-солевым буфером (400 мкл) («Helikon», США), центрифугируя в течение 5 мин при 900g. Удаляли супернатант и ресуспендировали оставшиеся клетки в 100 мкл Ca²⁺-связывающего буфера. Затем добавляли 1 мкл FITC-меченных AnnexinV-антител и 10 мкл пропидия йодида, тщательно перемешивали на микроцентрифуге-вортекс, в течение 10

мин инкубировали на льду в темноте. Далее добавляли 400 мкл охлажденного буфера и перемешивали.

Образцы клеточных суспензий анализировали на проточном цитофлуориметре FACS CantoII («Becton-Dickinson», США) с аргоновым лазером. Определяли несколько параметров: малое угловое светорассеяние (FSC), характеризующее размер клетки, боковое светорассеяние (SSC), характеризующее цитоплазматические, а также мембранные особенности клетки, и показатель зеленой флуоресценции (флуоресцеин изотиоцианат – FITC – 530 нм). Гейтинг исследуемой популяции клеток проводили в координатах FSC (ось абсцисс) и SSC (ось ординат). Затем данную популяцию клеток анализировали на наличие флуоресценции в координатах на основе Dot Plot. Использовали автоматическое программное обеспечение и методы сбора и анализа данных с высоким разрешением (1024 канала) (рис.8). Полученные результаты выражали в процентах (отношение числа клеток, связавших аннексин V на поверхности мембраны, к общему числу клеток).

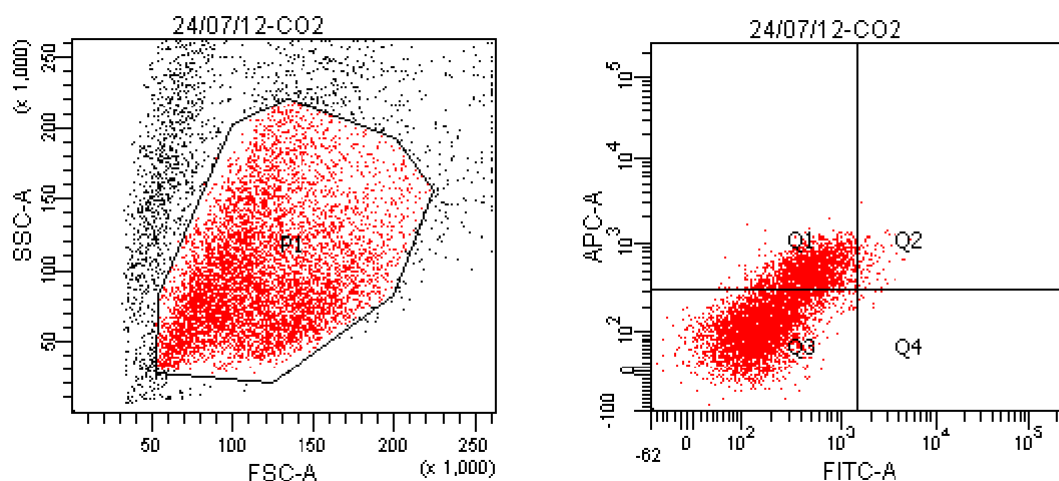


Рис 8. Гейтинг и распределение FITC-меченных клеток в координатах Dot Plot (по данным собственных исследований)

2.2.5 Оценка распределения клеток по фазам клеточного цикла

Для оценки распределения клеток по фазам клеточного цикла клетки подвергали пермеабиллизации и окрашиванию с использованием набора

CycleTestKit («BD Bioscience», США). Метод основан на способности связывания ядерной ДНК с флуоресцентной меткой с последующим подсчетом сигнала флуоресценции с помощью проточной цитометрии. Известно, что клетки в G_1 -фазу клеточного цикла имеют одну копию ДНК и поэтому обладают 1X интенсивностью флуоресценции. Клетки в G_2/M -фазе имеют в своем составе двухкопийную ДНК и, соответственно, 2X интенсивность. Таким образом, клетки в S-фазе синтеза ДНК будут иметь промежуточную флуоресценцию между 1X и 2X популяциями клеток.

Для анализа ploидности ДНК в тестируемом образце концентрация клеток должна составлять $5,0 \cdot 10^5$ клеток. Образцы трижды промывали фосфатно-солевым буфером; к клеточному осадку добавляли 250 мкл трипсинового буфера, осторожно перемешивали, постукивая рукой по пробирке. Инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Не удаляя трипсиновый буфер, добавляли 200 мкл раствора, содержащего ингибитор трипсина и РНК-буфер в каждую пробирку, осторожно перемешивали, постукивая рукой по пробирке. После 10 мин инкубации при комнатной температуре добавленные ранее растворы не удаляли. Вносили в каждую пробирку 200 мкл холодного ($+2+8$ °C) раствора пропидиум йодида. Осторожно перемешивали и инкубировали 10 мин в темноте на льду. Далее образцы анализировали с использованием программного пакета ModFit7 для проточной лазерной цитометрии (Fax Canto2 («Beckton Dickenson», США)) (рис.9).

Результаты выражали в процентах распределения клеток по каждой из фаз клеточного цикла.

2.2.6 Оценка продукции активных форм кислорода

Уровень активных форм кислорода (АФК) в клетках определяли с помощью красителя с заблокированной флуоресценцией – дихлорфлуоресцеина диацетата (ДХФ-ДА) («Sigma», USA). Краситель, изначально не флуоресцирующий, пассивно проникая внутрь клетки,

обрабатывается эстеразами (отщепляется ацетатная группа) и переходит в полярное соединение, не способное диффундировать обратно из клетки. Дихлорофлюоресцеин ацетат после реакции с перекисью водорода превращается во флуоресцирующее соединение.

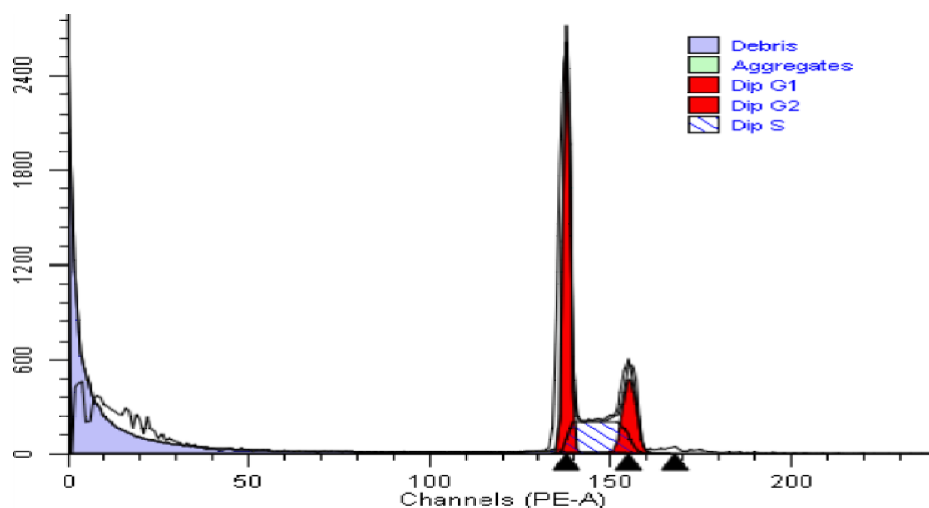


Рис.9 Распределение клеток по фазам клеточного цикла в интактной культуре клеток линии Jurkat (по данным собственных исследований)

Для определения уровня АФК в чистую полистириновую пробирку переносили 90 мкл суспензии клеток линии Jurkat (с исходным содержанием $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл) и добавляли 10 мкл рабочего раствора ДХФ-ДА. Клетки ресуспендировали и инкубировали в течение 20 мин при 37°C. Затем клетки осаждали в течение 10 мин при 900g, сливали надосадок и ресуспендировали оставшиеся в 200 мкл фосфатно-солевого буфера («Helikon», США). Центрифугировали при 900g в течение 10 мин, удаляли супернатант и добавляли 400 мкл фосфатно-солевого буфера. Пробы помещали на лед и анализировали уровень продукции АФК по интенсивности свечения красителя (FL-1 канал) на проточном цитофлуориметре (Fax Canto2 («Beckton Dickenson», США)).

Результаты исследования выражали в условных единицах (свечение на клетку).

2.2.7 Оценка митохондриального трансмембранного потенциала

Количество клеток линии Jurkat со сниженным уровнем потенциала митохондриальных мембран ($\Delta\psi$) определяли с использованием набора реагентов «MitoScreen» («BD Pharmingen», США). Метод основан на том, что флуорохром JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлора-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазол карбоцианин иодид) способен существовать в двух различных состояниях - агрегатах и мономерах. JC-1-мономер быстро проникает через митохондриальную мембрану живой клетки, в результате чего внутри митохондрии формируются JC-1-агрегаты, характеризующиеся красным спектральным свечением ($\lambda=590$ нм), которое может быть измерено на FL-2 канале проточного цитометра [Mathur A. et al., 2000]. При деполяризации митохондриальной мембраны, являющейся ранним признаком апоптоза, JC-1 не накапливается внутри митохондрии и находится в цитоплазме в виде мономерной формы. Последняя характеризуется зеленым спектральным свечением ($\lambda=525$ нм), регистрируемым в FL-1-канале.

В чистую полистириновую пробирку переносили 1 мл суспензии клеток, содержащей 10^6 клеток, и центрифугировали при 900g 5 мин при комнатной температуре. К клеточному осадку добавляли 0,5 мл свежеприготовленного (согласно инструкции производителя) раствора JC-1. Клетки ресуспендировали и инкубировали 10-15 мин при 37° C. Затем клетки дважды отмывали буфером. Окрашенные JC-1 клетки анализировали на проточном цитометре (Fax Canto2 («Beckton Dickenson», США)), определяя процентное содержание клеток с нормальным уровнем митохондриального трансмембранного потенциала (FL-2 свечение, FL-1 свечение) и процент клеток со сниженным его значением (FL-1 свечение) (рис. 10).

Полученные результаты выражали в процентах (отношение числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом к общему числу клеток).

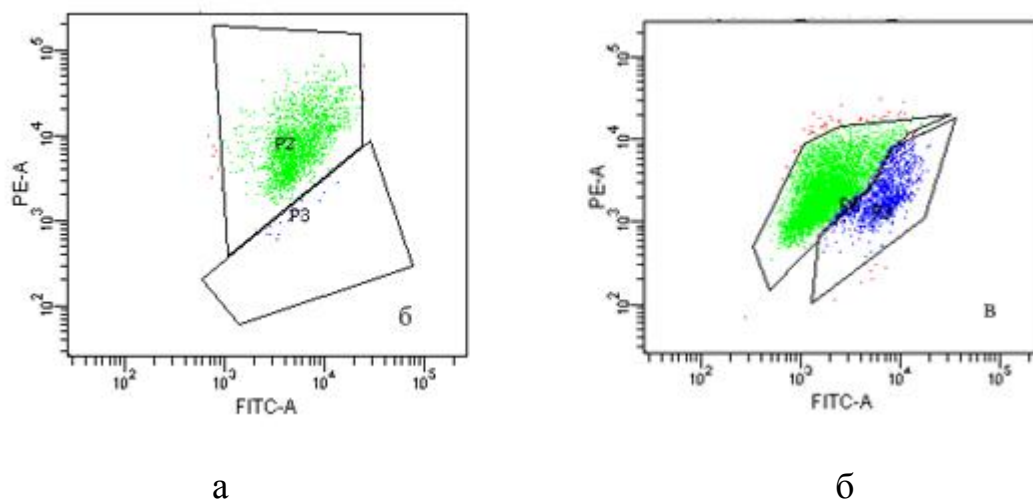


Рис 10. Количество клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом (P3 область) (по данным собственных исследований):

а – интактные клетки линии Jurkat;
 б – клетки линии Jurkat, инкубированные с 50 мкМ CORM-2 (24ч)

2.2.8 Оценка количества TNF R1-позитивных клеток

Содержание клеток, презентующих на своей поверхности мембранную форму рецептора к фактору некроза опухоли- α 1-го типа TNF-R1 (CD120), в культуре клеток линии Jurkat определяли методом лазерной проточной цитофлуориметрии.

После культивирования клетки отмывали фосфатно-солевым буфером и окрашивали стандартными моноклональными антителами к данному рецептору, меченными ФИТЦ («Beckman Coulter», Франция), согласно протоколу фирмы-производителя в течение 30 мин.

Анализ образцов проводили на лазерном проточном цитофлуориметре FACS CantoII («Becton-Dickinson», США). В гейте лимфоцитарных клеток анализировали количество клеток, имеющих зеленую флуоресценцию ФИТЦ на одномерной гистограмме (рис.11).

Результаты исследования выражали в процентах (отношение числа клеток, презентующих на своей поверхности TNF-рецептор, к общему числу клеток).

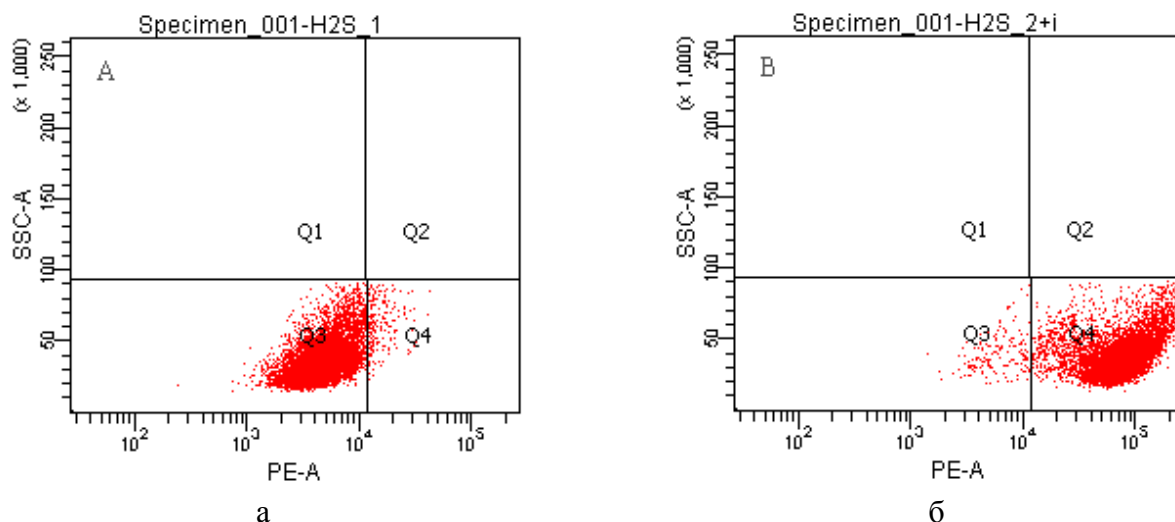


Рис. 11 Оценка количества TNFR1+-клеток (Q4) (по данным собственных исследований):

а – культивировании клеток со 10 мМ NaHS;

б– культивировании клеток с 0,265 мкМ SB 203580 и 10 мМ NaHS

2.2.9 Оценка продукции TNF- α в супернатантах клеточных культур

Определение концентрации TNF- α проводили в супернатантах культур клеток линии Jurkat после воздействия на них донорами исследуемых газовых транзиттеров и ингибитором p38 MAP киназы. Для оценки уровня продукции TNF- α клетками пробирки с клеточной взвесью центрифугировали 10 мин при 900g, супернатант собирали и проводили количественное определение уровня TNF- α методом твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» анализа.

Для выполнения процедуры иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией производителя тест-системы («Invitrogen», США) в 6 ячеек предварительно промытого буфером микропланшета добавляли по 100 мкл «0 дозы» и стандартов цитокина с известными концентрациями. В остальные 96 лунок вносили 200 мкл исследуемых супернатантов и инкубировали в течение 1 ч при 37°C при непрерывном встряхивании. После нескольких циклов промывки в каждую ячейку добавляли по 100 мкл раствора вторичных антител и проводили часовую

инкубацию при 37°C. Промыв планшеты буфером и дистиллированной водой, в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. После инкубации, промыв микропланшет, в каждую ячейку добавляли по 100 мкл раствора субстрата с красителем. Через 10-15 мин в лунки вносили по 50 мкл стоп-реактанта.

Оптическую плотность полученного окрашенного раствора, пропорциональную концентрации определяемого вещества, регистрировали колориметрически с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм. Калибровочную кривую строили с использованием среды, не содержащей продукты жизнедеятельности клеток («0 доза») и стандартных растворов с известной концентрацией.

Результаты проведенного исследования выражали в пг/мл.

2.2.10 Оценка уровня экспрессии мРНК генов белков-регуляторов апоптоза и клеточного цикла

Для количественного определения уровня экспрессии мРНК генов *x-IAP*, *AVEN*, *Bcl-2*, *Bcl-X_L*, *Bax*, *Bad*, *p21* и циклин *D1* в клетках линии Jurkat был использован метод ПЦР в режиме реального времени. Данный метод позволяет отслеживать кинетику накопления продуктов амплификации исследованных генов. В нашем случае это достигалось введением в реакционную смесь интерколирующего флуоресцентного агента SYBR Green I. Связываясь с формирующейся в процессе элонгации двухцепочечной ДНК, SYBR Green I активируется и начинает флуоресцировать. Таким образом, интенсивность флуоресценции возрастает пропорционально количеству продукта амплификации.

Выделение РНК из клеток линии Jurkat осуществляли сорбентно-колоночным методом (QIAmp RNA Blood mini Kit, QIAGEN, Германия).

Метод основан на связывающем свойстве мембран на силико-гелевой основе и микроспиновой технологии.

Для этого 500 мкл суспензии клеток ($2,0 \cdot 10^6$ на 1 мл) осаждали центрифугированием при 5000g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, добавляли к клеточному осадку 500 мкл лизирующего буфера RLT, содержащего 10 мкл 14,5 М β -меркаптоэтанола на 1 мл буфера, тщательно перемешивали пипетированием до полного удаления конгломератов клеток. Затем лизат центрифугировали 2 мин при 10 000g на QIAshredder колонках. Далее добавляли этанол для улучшения связывания, и образец наносили на QIAmp колонки. Контоминанты удаляли, тотальная РНК элюировалась в 30 мкл воды.

Оценку качества выделенного препарата РНК проводили по итогам электрофоретического разделения в 1,2% агарозном геле и буфере ТАЕ (40 mM Трис-уксусная кислота, 1mM ЭДТА (pH=8,0)). Чистоту всех тестируемых образцов тотальной РНК оценивали по наличию в агарозном геле-электрофореze двух бандов, соответствующих 18S и 28S субъединицам рРНК.

Возможные примеси геномной ДНК удаляли при помощи переосаждения в 2,5 М LiCl. Для этого раствор РНК инкубировали на льду в присутствии 2,5 М LiCl в течение 30 мин, затем в течение 15 мин при $t = -20^\circ\text{C}$. Центрифугировали в течение 15 мин при 10000g, тщательно собирали супернатант, после чего дважды отмывали осадок 80% этанолом, высушивали и растворяли в 22 мкл воды класса Milly Q.

Следующим шагом синтезировали ДНК на матрице мРНК при участии обратной транскриптазы. Для этого готовили реакционную смесь: 9 мкл (0,5-2 мкг) РНК, 1 мкл (100 нг) статистического праймера (N_9) (праймера, подобранного к среднестатистической последовательности ДНК), 10 мкл RT-буфера (20 mM Tris-HCl (pH=8,3), 5 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 100 mM KCl, 0,4 mM dNTP), 200 ед. акт. ДНК-зависимой РНК полимеразы (MMuLV-RT)

(«Promega», США). Реакцию обратной транскрипции проводили в течение 60 мин при $t=42^{\circ}\text{C}$.

Полученный фрагмент ДНК амплифицировали методом ПЦР в режиме реального времени с использованием SYBR Green I («Molecular Probe», США) на амплификаторе Mini Opticon («Bio-Rad», США).

ПЦР проводили в объеме 25 мкл, реакционная смесь содержала K25 буфер (x1), 0,2mM dNTP, 300 nM праймеров, 0,5 ед. акт. SmartTaq ДНК-полимеразы блокированной антителами (Диалат, Россия), SYBRGreen I [1:25000] и 0,1-5 нг кДНК.

Протокол амплификации:

- первичная денатурация – 3 мин при 96°C ;
- амплификационный цикл (x 40): денатурация – 10 сек при 96°C , отжиг праймеров – 7 сек при 60°C , элонгация – 7 сек при 72°C , съём сигнала – 10 сек при температуре плавления продукта амплификации (определялась индивидуально для каждой пары праймеров, при анализе кривой плавления);
- построение кривой плавления – нагревание амплификационной смеси с 75 до 95°C , с шагом $0,5^{\circ}\text{C}$, сопровождающиеся съёмом флуоресцентного сигнала на каждом шаге в течении 10 сек.

Праймеры, позволяющие специфично амплифицировать фрагменты кДНК генов, представлены в таблице 3.

Для каждой пары праймеров были подобраны оптимальные режимы амплификации. Для этого варьировали температуру отжига праймеров, состав амплификационного буфера, а также параметры амплификационного цикла.

Оптимизацию условий ПЦР проводили при амплификации пяти последовательных 4-х кратных разведений кДНК, каждая точка была представлена в двойном повторе. Качество реакции амплификации считалось приемлемым при выполнении следующих условий:

- разница между значениями C_t (номер цикла в точке пересечения кинетической кривой порогового уровня) превышала 0,5 цикла;
- индекс корреляции между расчетными значениями количества кДНК в пяти точках (пять последовательных 4-х кратных разведений) и экспериментальными значениями превышала 0,95 ($r^2 > 95$);
- эффективность реакции амплификации превышала 90% ($E > 90\%$);
- специфичность реакции амплификации (подтверждалась по отсутствию дополнительных пиков на кривой плавления).

Таблица 3

Структура специфических праймеров

Ген	Праймеры
AVEN	F: 5'-GATTTTCAGTGTCTCCTTAG-3'
	R: 5'-CCTTGCCATCATCAGTTCTC-3'
x-IAP	F: 5'-ATAGTGCCACGCAGTCTACAA-3'
	R: 5'-AGATGGCCTGTCTAAGGCAAA-3'
BCL-2	F: 5'-CCTGTGGATGACTGAGTACCT-3'
	R: 5'-GCCAAACTGAGCAGAGTCTTC-3'
Bax	F: 5'-CGAACTGGACAGTAACATGGA-3'
	R: 5'-TGCTGGCAAAGTAGAAAAGG-3'
BCL _{XL}	F: 5'-TTACCTGAATGACCACCTAGAG-3'
	R: 5'-GCATTGTTCCCATAGAGTTCC-3'
BAD	F: 5'-GGATGAGTGACGAGTTTGTG-3'
	R: 5'-CCTGCCCCAAGTTCCGATC-3'
p21	F: 5'-GGCAGACCAGCATGACAGATTTC-3'
	R: 5'-CGGATTAGGGCTTCCTCTTGG-3'
Cycline D1	F: 5'-TCTACACCGACAACATCATCCG-3'
	R: 5'-TCTGTTTGTCTCTCCGCCTCT-3'
RPL32	F: 5'-CATTTCCGAAGCGAGTGTCT-3'
	R: 5'-GAGCGATTCCGGACTACCTT-3'
Actin1	F: 5'-CATTTCCGAAGCGAGTGTCT-3'
	R: 5'-GAGCGATTCCGGACTACCTT-3'

Температуру плавления праймеров (T_m), определяющую температуру отжига олигонуклеотидов на матрице, выявляли эмпирически при

проведении ПЦР в режиме, позволяющем задавать градиент температур в пределах блока амплификатора. Температуру плавления продукта амплификации, определяющую температуру съема флуоресцентного сигнала, вычисляли при анализе кривой плавления (рис 12, 13).

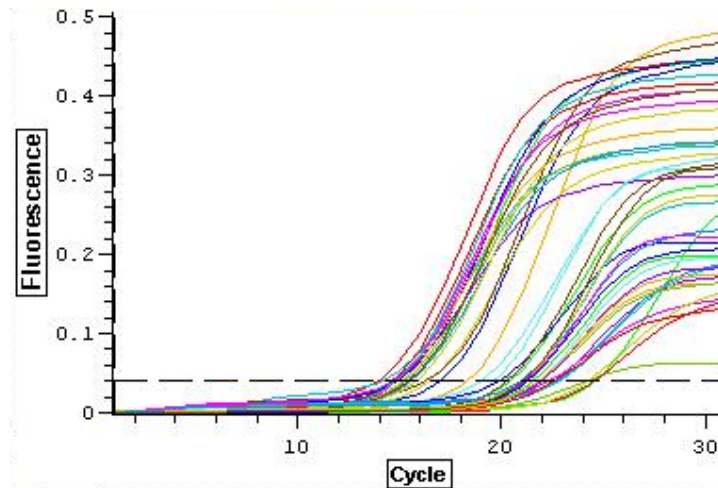


Рис.12. Графическое представление кинетики накопления продукта ПЦР гена *bcl-2* и гена *β-actine* при амплификации экспериментальных образцов в логарифмических координатах. Каждый из образцов представлен в двух повторах

Для нормализации начального количества мРНК в образце и эффективности обратной транскрипции измерялось количество кДНК гена β -актин — гена «домашнего хозяйства», в относительно равной степени экспрессирующегося во всех клетках [Butte A.J., 2001].

Амплификация каждой серии образцов сопровождалась постановкой контроля (пять точек в двойных повторах, каждая последующая точка представляла собой 5-ти кратное разведение предыдущей) (рис.14).

Для определения относительного количества кДНК в образце использовался критерий ddCt.

Результаты выражали в условных единицах (отношение числа циклов амплификации исследуемого гена к количеству циклов амплификации генов «домашнего хозяйства»).

2.2.11 Определение активности каспазы 3 и 9

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

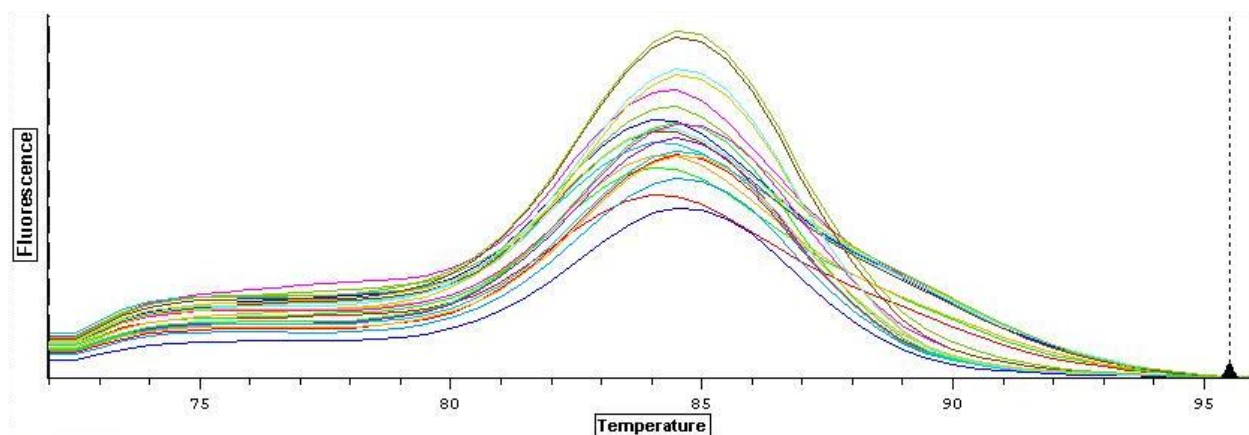


Рис.13. Графическое представление кривой плавления продукта ПЦР гена *bcl-2* при амплификации экспериментальных образцов. Каждый из образцов представлен в двух повторах

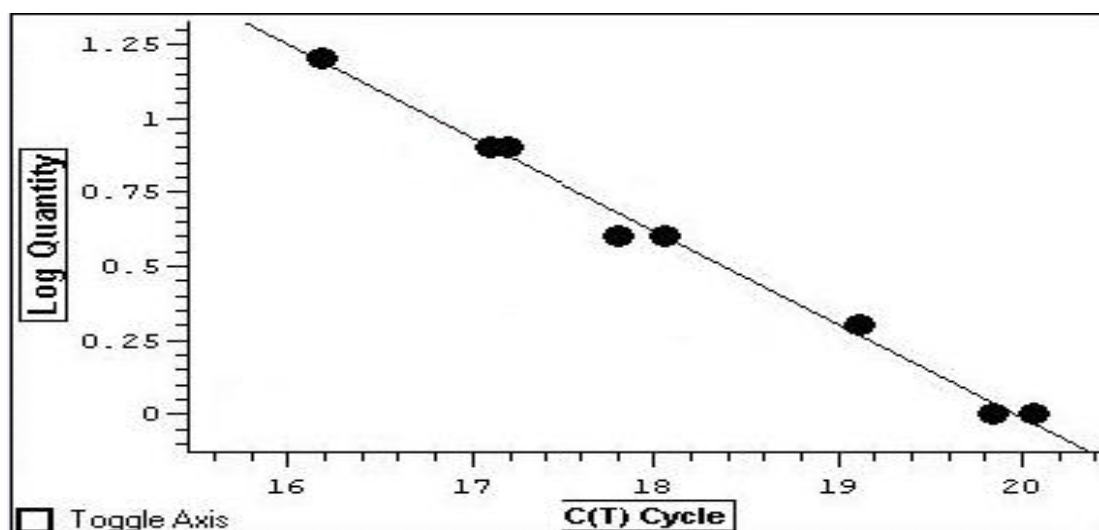


Рис.14. Проекция значений C_t серии двукратных разведений для построения калибровочной кривой гена *bcl-2*

Клетки ресуспендировали в 50 мкл лизирующего буфера, инкубировали на льду в течение 10 мин и центрифугировали при 10000g 10 мин. Супернатант (цитозольный экстракт) использовали для определения

количества белка и активности каспаз. 50-200 мг белка разводили в 50 мкл лизирующего буфера, добавляли 50 мкл реакционного буфера и 5 мкл субстрата для каспаз. Инкубировали при 37 °С в течение 24 ч, добавляли буфер для разведения и измеряли активность каспаз на спектрофотометре при длине волны 400-405 нм против соответствующего цитозольного экстракта и буферов для каждой пробы. Полученные значения экстинкции в интактных клетках линии Jurkat принимали за единицу.

2.2.12 Оценка содержания белков-регуляторов апоптоза и клеточного цикла

Для определения содержания белков-регуляторов апоптоза (Bcl-2, Bcl-X_L, Bad, AVEN, xIAP) и клеточного цикла (p53, p21, pRb, Cdk4, циклин D1) был применен метод вестерн-блоттинга. Данная методика позволяет определить искомый антиген в общей смеси клеточных белков и оценить изменения его содержания по сравнению с контролем.

Для получения цельноклеточных лизатов клетки линии Jurkat осаждали центрифугированием при 900g в течение 5 мин и отмывали в холодном фосфатно-солевом буфере. Для разрушения клеток добавляли лизирующий буфер (50 mM Трис – HCl (pH = 6,5), 100 mM дитиотреитол, 2% додецил сульфат натрия (ДСН), 15% глицерол («Helikon», США), смесь протеазных ингибиторов («Sigma», США) и фосфатно-солевой буфер). Смесь тщательно перемешивали, инкубировали 10 мин на льду, затем 10 мин при температуре 95-100°C, центрифугировали при 10000g в течение 10 мин. Полученные лизаты использовали для определения содержания в клетках белков-ингибиторов каспаз (xIAP и AVEN), а также белков-регуляторов апоптоза (Bcl-2, Bcl-XL и Bad) и клеточного цикла (p53, p21, pRb, Cdk4, циклин D1).

Для разделения полученной смеси белков равные объемы лизата наносили на ДСН-ПААГ (SDS-PAGE) гель, содержащий 10% бис-акриламид и 0,1% ДСН («Helikon», США). Белки разделяли по молекулярной массе под действием электрического поля.

Для последующего исследования белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США). Перенос белков осуществляли электрофоретически в течение 1,5 ч при напряжении 10-15 В на дорожку. Нитроцеллюлозные блоты блокировали 1% желатином в фосфатно-солевом буфере и инкубировали с первичными антителами к ключевым регуляторам апоптоза. Использовали антитела к белкам–ингибиторам каспаз (AVEN («Sigma», США), xIAP («Sigma», США)), белкам–регуляторам апоптоза (Bcl-X_L («Sigma», США), Bad («Biosource», США), Bcl-2 («Biosource», США)) и клеточного цикла (p53 («Biosource», США), p21 («Biosource», США), pRb («Sigma», США), Cdk4 («Biosource», США), циклин D1 («Sigma», США)) в разведении 1:20000. Добавляли вторичные антитела с пероксидазной меткой («Biosource», США). Для визуализации результатов исследования использовали хемилюминесцентный метод.

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 («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].

2.2.13 Статистический анализ результатов исследования

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].

Глава 3. Направленность апоптотических изменений клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов в условиях воздействия доноров газов оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода

3.1 Апоптоз клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов в условиях воздействия доноров оксида азота

Газотрансмиттеры (оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода) являются высокотоксичными веществами, однако, несмотря на это свойство, они продуцируются практически всеми клетками организма, что указывает на высокую значимость данных молекул в регуляции жизнедеятельности клеток, тканей и организма в целом.

В настоящее время известно о существовании альтернативных путей образования оксида азота (при ацидификации или восстановлении нитритов). Однако основная часть NO в организме млекопитающих образуется энзиматически с участием NO-синтаз (NOS). Данные ферменты конвертируют аргинин в цитрулин и оксид азота в результате NADPH- и O₂-зависимой реакции. Существуют три изоформы NO-синтаз, две из них конститутивные (NOS-1; n-NOS нейрональная и NOS-3; eNOS эндотелиальная), а также одна индуцибельная (iNOS, NOS-2). Конститутивные изоформы выявляются в нейронах, эндотелиоцитах, тромбоцитах, нейтрофилах и других клетках [Зенков Н.К. и соавт., 2001; Голиков П.П., 2004]. Ферментативная активность изоформ NOS регулируется на различных уровнях, включая транскрипцию, трансляцию, посттрансляционные и биохимические модификации [Bredt D.S., 1999; Fulton D. et al., 2001]. Существуют два основных различия между этими изоформами, во-первых, по продолжительности генерирования NO и, во-вторых, по локальной концентрации синтезированного оксида азота. Зависимость от кальмодулина важна для конститутивных форм ферментов, при этом кальций необходим для короткого и мощного возрастания концентрации оксида азота. iNOS, имея кальмодулин в качестве субъединицы, способна к продолжительной активации и продукции оксида

азота в течение длительного периода. Посттранскрипционные модификации (фосфорилирование eNOS) могут превратить данную конститутивную изоформу, в норме способную к короткому мощному синтезу NO, в фермент, продолжительное время генерирующий оксид азота [Ghosh D.K. and Salerno J.C., 2003]. Ферментативная активность NO синтаз контролируется доступностью субстрата и кофактора, а также уровнем электронного транспорта [Stuehr D.J. et al., 2004]. Количество фермента и его внутриклеточная локализация определяют концентрацию оксида азота в микроокружении молекулярных мишеней. Субстраты и кофакторы, контролирующие активность NOS, также вовлечены в другие метаболические пути, интегрируя таким образом активность NOS с другими внутриклеточными процессами.

В присутствии достаточного количества кофакторов (NADPH, FMN, BH₄, FAD) активность NOS определяется доступностью аргинина и кислорода. Существуют три основных пути метаболизма аргинина, влияющих на активность NOS [Morris S.M.J., 2007]:

- 1) конкурирование с аргиназой;
- 2) потребление аргинина клеткой и его метилирование;
- 3) протеолизис с формированием ассиметричного диметиларгинина (ADMA).

Аргиназа - первый фермент в цепочке синтеза полиаминов - может иметь значительное влияние на активность NOS за счет конкуренции за внутриклеточный пул аргинина. Поскольку K_m для аргиназы выше данного параметра для NOS, а внутриклеточная концентрация аргиназы также превышает таковую для NOS, распределение аргинина между аргиназой и iNOS практически эквивалентно. В случае nNOS и eNOS аргиназа потребляет большее количество аргинина [Morris S.M.J., 2005].

Существует ряд исследований, подтверждающих зависимость между активностью NOS и доступностью аргинина для данного фермента. Внутриклеточное поступление аргинина регулируется транспортером

катионных аминокислот (CAT). Данный белок контролируется рядом факторов. Так, лизин напрямую конкурирует с аргинином за внутриклеточную доставку [Morris S.M.J., 2004, 2005]. Образующийся в результате нитрозилирующего стресса нитроксил (HNO) уменьшает активность транспортера, что может служить механизмом обратной связи, регулирующим активность NOS [Saenz D.A. et al., 2007]. Одним из последствий недостаточности аргинина является переключение NOS с синтеза NO на генерацию супероксида, что может объяснять защитные функции NOS в одних условиях и повреждающие - в других [Pou S. et al., 1999].

Другим важным аспектом метаболизма аргинина является генерация ADMA, известного как ингибитор NOS. ADMA образуется при метилировании аргинина белков с последующим протеолизом модифицированного протеина [Tran C.T. et al., 2003]. Исследования A.J. Cardounel et al. [2005] показали, что ADMA не только ингибирует nNOS, но и переключает данный фермент с продукции NO на генерацию супероксида, что может являться важным патогенетическим фактором развития ряда заболеваний [Cardounel A.J. et al., 2005].

Кислород служит важнейшим субстратом, регулирующим активность NOS. Изменение парциального давления кислорода оказывает значительное влияние на активность NOS. Различная зависимость от кислорода является основной отличительной чертой функционирования изоформ NOS и основополагающим фактором, определяющим роль данных изоформ *in vivo*. K_m (концентрация кислорода, при которой активность фермента достигает значений половины от максимальной) кислорода для различных изоформ NOS значительно различается. Когда концентрация кислорода достигает уровня K_m или становится ниже таковой, активность фермента напрямую зависит от его концентрации, приводя к прямой корреляции между активностью продукции оксида азота и внутриклеточным уровнем кислорода. Если концентрация кислорода начинает превышать K_m ,

зависимость активности фермента от концентрации кислорода уменьшается и энзим становится нечувствительным к дальнейшему повышению уровня O_2 . Константа Михаэлиса для eNOS составляет 23 μM , 135 μM - для iNOS и 350 μM - для nNOS [Stuehr D.J. et al, 2004]. Столь значительные различия в уровне K_m предполагают, что, например, синтез NO за счет nNOS в большей степени зависит от уровня колебаний концентрации кислорода, чем eNOS. При этом eNOS может быть полностью активирована при низком давлении кислорода, что позволяет регулировать такую жизненно важную функцию сердечно-сосудистой системы, как сосудистый тонус.

Концентрация кислорода в тканях в норме колеблется от 10–20 до 60 μM [Buerk D.G., 2007]. Таким образом, тип ткани определяет активацию различных изоформ NOS. Кроме того, оксид азота ингибирует основной механизм потребления кислорода клеткой – митохондриальное дыхание [Mason M.G. et al., 2006; Buerk D.G., 2007]. Повышение уровня NO увеличивает концентрацию кислорода, который, в свою очередь, увеличивает активность NOS. Также необходимо отметить, что при низких концентрациях кислорода NOS генерирует супероксид в больших количествах, чем оксид азота. Поскольку данные каскадные процессы могут привести к бесконтрольной продукции NO, существует механизм обратной связи, ограничивающий их. Так, высокий уровень NO ингибирует ферментативную активность NOS, ограничивая наработку оксида азота.

Еще одним важным фактором, регулирующим активность NOS, является их внутриклеточная локализация. Гидрофобные области клетки (например, мембраны) имеют в десятки раз более высокие концентрации газов (NO, O_2 , CO), по сравнению с гидрофильными регионами, вследствие растворимости газов [Liu X. et al., 1998]. Активность eNOS может быть увеличена в 10 раз за счет перемещения в мембраны клеток, в основном из-за большей доступности кислорода [Fulton D. et al., 2001]. Транслокация iNOS в активированные макрофаги может увеличить активность наработки NO макрофагами. При этом количество оксида азота, образованного клетками,

активированными цитокинами и ЛПС, значительно различается, несмотря на одинаковый уровень NOS в клетках. Было показано, что повышение генерации NO в клетках ассоциировано с повышением содержания iNOS в мембране [Mason M.G. et al., 2006]. NOS присутствует как в цитозоле, так и в мембране клеток. Транслокация ферментов синтеза оксида азота к участкам, различающимся по степени доступности кислорода, оказывает значительное влияние на активность NOS.

Таким образом, продукция NO и внутриклеточная сигнальная трансдукция с его участием зависят от транспорта аргинина, состояния конкурирующих метаболических путей, образования внутриклеточных ингибиторов NOS и доступности кислорода. Учитывая многообразие факторов, влияющих на активность NOS, а также механизмов отрицательной обратной связи, в настоящем исследовании для повышения внутриклеточной концентрации оксида азота использовались доноры данного газа. Для идентификации роли оксида азота в регуляции клеточного гомеостаза мы применяли два донора данного вещества – нитропруссид натрия и NOC-5.

В настоящее время известно, что NO ингибирует апоптоз лейкоцитов, нейтрофилов, гепатоцитов, трофобластов и эндотелиальных клеток, но обладает проапоптотическим действием в отношении тимоцитов, клеток поджелудочной железы, миобластов скелетных мышц и корковых нейронов [Степовая Е.А. и соавт., 2008; Fukuo K. et al., 1996; Stassi G. et al., 1997; Huerta-Yepez S. et al., 2004; Tuteja N. et al., 2004]. Избирательность регулирующего действия NO в отношении апоптоза различных типов клеток имеет высокую физиологическую значимость. Так, ингибирование программированной гибели нейтрофильных лейкоцитов в очаге воспаления с участием NO способствует более длительному функционированию данных клеток и, следовательно, более эффективной элиминации патогена. Данные литературы убедительно свидетельствуют о том, что оксид азота способен активировать апоптоз опухолевых клеток [Huerta-Yepez S. et al., 2004; Olson S., Garban H., 2008]. При этом в литературе недостаточно освещены

сравнительные аспекты действия оксида азота на апоптоз опухолевых и нормальных клеток. Это указывает на необходимость изучения влияния данного газового трансммиттера на процессы реализации апоптоза «здоровых» и бласттрансформированных клеток с целью селективного управления программированной гибели последних с использованием модуляторов внутриклеточного содержания оксида азота.

В результате проведенного нами исследования было показано, что увеличение числа некротически-измененных клеток в культурах клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, было зарегистрировано только при инкубации клеток с нитропруссидом натрия в концентрации 500 мМ в течение 15 мин ($p < 0,05$) (табл.4, 5). Одной из причин некроза клеток при воздействии высоких концентраций оксида азота может быть подавление митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования [Hortelano S. et al, 1997].

Число аннексин-положительных мононуклеарных лейкоцитов после 15 мин воздействия на клетки SNP во всех исследованных концентрациях не изменялось ($p > 0,05$) (табл. 5). Нами не было выявлено различий в числе мононуклеарных лейкоцитов с апоптотическими признаками после 24-х часовой инкубации клеток с 5, 50, 100, 500 мкМ и 1 мМ SNP, по сравнению с соответствующим показателем в интактной культуре ($p > 0,05$). При действии SNP в концентрациях 10, 50 и 100 мМ отмечалось снижение количества апоптотических клеток относительно их содержания в контроле ($p < 0,05$). Уменьшение числа аннексин-положительных клеток при инкубации их с SNP в концентрациях 10, 50 и 100 мМ сопровождалось увеличением количества некротически-измененных мононуклеарных лейкоцитов ($p < 0,05$). Интенсификация некроза является проявлением токсического действия оксида азота, реализующегося при непрерывном и длительном контакте данного газа с клетками. Воздействие 5, 50, 100, 500 мкМ и 1мМ SNP в течение 24 ч также приводило к увеличению числа некротизированных

клеток, по сравнению с количеством их в интактной культуре ($p < 0,05$) (табл. 5).

При исследовании влияния NO на апоптотическую гибель клеток линии Jurkat было продемонстрировано, что увеличение числа аннексин-положительных клеток происходило при 15-ти минутной инкубации клеток с SNP в концентрации 50 и 100 мМ и достигало 14,05 (7,85-18,00)% и 16,95(14,15-21,80)%, соответственно, что достоверно превышало аналогичные показатели в контроле – 3,50(2,70-4,20)% ($p < 0,05$). Проапоптотический эффект NO ряд авторов связывает с повышением экспрессии Fas рецептора [Olson S., Garban H., 2008]. Другой возможный путь запуска апоптоза связан со способностью оксида азота провоцировать повышение проницаемости мембраны митохондрии и выход в цитоплазму клетки апоптоз-индуцирующих факторов [Hortelano S. et al, 1997; Tuteja N. et al., 2004]. Воздействие донора оксида азота нитропруссид натрия в концентрациях 5, 50, 100 и 500 мкМ, 1 и 10 мМ в течение 15 мин не сопровождалось интенсификацией апоптотической гибели клеток Т-лимфобластной лейкемии. Показано, что оксид азота вызывает апоптоз некоторых типов опухолевых клеток за счет инактивации транскрипционных факторов NF- κ B и YY1, модуляции активности транскрипционного фактора p53 [Hemish J. et al., 2003].

Инкубация клеток линии Jurkat с донором оксида азота в концентрациях 5, 50, 100 мкМ, 10, 50 и 100 мМ в течение 24 ч не сопровождалась интенсификацией апоптотической гибели ($p > 0,05$). Число апоптотически-измененных клеток возрастало при инкубации клеток линии Jurkat с 500 мкМ и 1 мМ SNP, по сравнению с количеством их в интактной культуре ($p < 0,05$). Количество некротизированных клеток линии Jurkat увеличивалось при воздействии всех использованных концентраций SNP после 24-х часовой аппликации, приближаясь к 100% при действии 10, 50 и 100 мМ SNP (табл. 4).

Нитропруссид натрия является сложной молекулой, структура которой не позволяет исключить участие других составных компонентов (циан-группы) в регуляции апоптоза Jurkat клеток и мононуклеарных лейкоцитов. Для подтверждения ключевой роли NO в выявленных по итогам проводимого исследования изменениях показателей программированной гибели клеток нами использовался еще один специфический донор оксида азота NOC-5.

После 15-ти минутного воздействия на клетки линии Jurkat 5, 50, 100, 500 мкМ и 1 мМ NOC-5 интенсификации некротической и апоптотической гибели клеток, по сравнению с контролем не отмечалось ($p>0,05$). При этом обращало на себя внимание увеличение числа как апоптотических, так и некротизированных клеток линии Jurkat относительно контроля после 24-х часовой инкубации с 5, 50, 100, 500 мкМ и 1 мМ NOC-5 ($p<0,05$) (табл.6).

Некротическая гибель мононуклеарных лейкоцитов после 15-ти минутной и 24-х часовой инкубации клеток с 5, 50, 100, 500 мкМ и 1 мМ NOC-5, по сравнению со значениями соответствующего показателя в интактной культуре не изменялась ($p>0,05$). В результате оценки апоптоза мононуклеарных лейкоцитов на 15-ти минутное и 24-х часовое воздействие 5, 50, 100, 500 мкМ и 1 мМ NOC-5 не было выявлено изменений в числе аннексин-положительных клеток, по сравнению с количеством их в контроле ($p>0,05$) (табл.7).

Было показано, что оксид азота сенсibiliзирует клетки рака яичника и аденомы простаты к TNF-индуцированному апоптозу за счет ингибирования NF-kB-зависимой экспессии (рис.15) [Huerta-Yepez S. et al., 2004].

Установлено участие NO в регуляции экспессии Fas-рецептора при сенсibiliзации оксидом азота клеток рака яичников к Fas-индуцированному апоптозу [Garbán H.J., Bonavida B., 1999]. Было показано также, что оксид азота индуцирует экспессию Fas-антигена через цГМФ-независимые механизмы в гладких мышцах [Fukuo K. et al., 1996] и праймирует β -клетки

поджелудочной железы к Fas-индуцированному апоптозу [Stassi G. et al., 1997].

Таблица 4.

Число клеток линии Jurkat с некротическими и апоптотическими признаками после 15 минутного и 24 часового воздействия различных концентраций донора оксида азота SNP, Me(Q1-Q3), n=4

Условия эксперимента	Число клеток линии Jurkat с некротическими признаками после 15 мин инкубации, %	Число клеток линии Jurkat с некротическими признаками после 24 ч инкубации, %	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками после 15 мин инкубации, %	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками после 24 ч инкубации, %
Интактные клетки	0,35 (0,15-0,45)	0 (0-0,15)	3,50 (2,70-4,20)	1,05 (0-1,55)
Клетки после воздействия 5 мкМ SNP	0,20 (0,10-0,30) p>0,05	4,00 (2,90-4,90) p<0,05	2,80 (1,50-3,40) p>0,05	1,20 (0,90-2,00) p>0,05
Клетки после воздействия 50 мкМ SNP	0,20 (0,10-0,30) p>0,05	6,80 (4,70-8,00) p<0,05	4,20 (4,00-5,50) p>0,05	1,50 (0,50-1,80) p>0,05
Клетки после воздействия 100 мкМ SNP	0,60 (0,40-0,70) p>0,05	3,70 (3,50-3,90) p<0,05	5,50 (1,70-5,90) p>0,05	2,30 (1,50-2,50) p>0,05
Клетки после воздействия 500 мкМ SNP	0,40 (0,20-0,50) p>0,05	4,60 (3,50-5,60) p<0,05	5,80 (4,20-5,60) p>0,05	8,90 (7,20-9,60) p<0,05
Клетки после воздействия 1 мМ SNP	0,50 (0,40-0,60) p>0,05	7,80 (3,40-8,80) p<0,05	7,85 (3,60-8,90) p>0,05	9,40 (8,60-10,00) p<0,05
Клетки после воздействия 10 мМ SNP	0,30 (0,20-0,40) p>0,05	73,45 (69,40-88,45) p<0,05	5,80 (3,45-8,50) p>0,05	0,40 (0-0,90) p>0,05
Клетки после воздействия 50 мМ SNP	0,20 (0,20-0,90) p>0,05	83,17 (76,20-87,49) p<0,05	14,05 (7,85-18,00) p<0,05	0,30 (0-0,60) p>0,05
Клетки после воздействия 100 мМ SNP	0,40 (0,30-1,30) p>0,05	87,70 (80,52-94,12) p<0,05	16,95 (14,15-21,80) p<0,05	1,19 (1,17-1,21) p>0,05
Клетки после воздействия 500 мМ SNP	78,50 (74,50-82,50) p<0,05	100,00 (100,00-100,00) p<0,05	Не проводилось	Не проводилось
p межгрупповое	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05

Примечание (здесь и в табл. 4-9, 11, 12, 14, 15, 17): p<0,05 - по сравнению с аналогичными показателями в соответствующей интактной культуре, n – количество экспериментов

Таблица 5.

Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими и апоптотическими признаками после 15 минутного и 24 часового воздействия различных концентраций донора оксида азота SNP, Me (Q1-Q3), n=4

Условия эксперимента	Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими признаками после 15 мин инкубации, %	Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими признаками после 24 ч инкубации, %	Число мононуклеарных лейкоцитов с апоптотическими признаками после 15 мин инкубации, %	Число мононуклеарных лейкоцитов с апоптотическими признаками после 24 ч инкубации, %
Интактные клетки	0,50 (0-0,10)	0,45 (0,35-0,75)	32,20 (18,80-35,40)	28,50 (24,85-29,30)
Клетки после воздействия 5 мкМ SNP	0,05 (0-0,10) p>0,05	3,30 (3,10-3,40) p<0,05	25,60 (23,60-26,70) p>0,05	23,70 (21,40-26,90) p>0,05
Клетки после воздействия 50 мкМ SNP	0,05 (0-0,10) p>0,05	4,50 (3,10-5,20) p<0,05	29,90 (21,00-38,80) p ₂ >0,05	30,50 (29,00-31,50) p>0,05
Клетки после воздействия 100 мкМ SNP	0,05 (0-0,10) p>0,05	4,30 (4,20-4,60) p<0,05	24,30 (13,70-30,50) p>0,05	27,40 (25,50-29,30) p>0,05
Клетки после воздействия 500 мкМ SNP	0,05 (0-0,10) p>0,05	5,30 (5,00-5,50) p<0,05	25,40 (18,70-26,00) p>0,05	35,50 (28,20-36,50) p>0,05
Клетки после воздействия 1 мМ SNP	0,05 (0-0,10) p>0,05	4,90 (4,10-5,90) p<0,05	26,90 (24,10-31,80) p>0,05	26,80 (24,40-28,30) p>0,05
Клетки после воздействия 10 мМ SNP	0,05 (0-0,10) p>0,05	71,65 (65,15-81,35) p<0,05	35,60 (24,60-36,60) p>0,05	12,30 (8,95-15,55) p<0,05
Клетки после воздействия 50 мМ SNP	0 (0-0) p>0,05	71,60 (64,65-73,95) p<0,05	24,90 (21,90-31,60) p>0,05	5,85 (4,75-6,65) p<0,05
Клетки после воздействия 100 мМ SNP	0 (0-0) p>0,05	80,75 (73,65-87,05) p<0,05	25,30 (22,70-30,80) p>0,05	3,30 (2,75-4,60) p<0,05
Клетки после воздействия 500 мМ SNP	92,30 (89,10-95,50) p<0,05	100,00 (100,00-100,00) p<0,05	Не определялось	Не определялось
p межгрупповое	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Идентификация специфического механизма, за счет которого NO может влиять на экспрессию Fas, продемонстрировала, что оксид азота напрямую действует на негативные регуляторные трансактивационные домены Fas промотора. Было установлено, что NO повышает экспрессию Fas-

рецептора различных опухолевых клеток за счет инактивации ДНК-связывающей активности транскрипционного репрессора Yin-Yiag 1 (YY1) к сайленсерному региону Fas промотора [Garban H.J., Bonavida B., 2001].

Таблица 6.

Число клеток линии Jurkat с некротическими и апоптотическими признаками после 15 минутного и 24 часового воздействия различных концентраций донора оксида азота NOC-5, Me(Q1-Q3), n=4

Условия эксперимента	Число клеток линии Jurkat с некротическими признаками после 15 мин инкубации, %	Число клеток линии Jurkat с некротическими признаками после 24 ч инкубации, %	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками после 15 мин инкубации, %	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками после 24 ч инкубации, %
Интактные клетки	0,35 (0,15-0,45)	0 (0-0,15)	3,50 (2,70-4,20)	1,05 (0-1,50)
Клетки после воздействия 5 мкМ NOC-5	0,20 (0,10-0,40) p>0,05	3,90 (3,20-4,00) p<0,05	4,00 (3,60-4,20) p>0,05	4,80 (4,50-5,10) p<0,05
Клетки после воздействия 50 мкМ NOC-5	0,20 (0,10-0,30) p>0,05	4,20 (4,10-4,40) p<0,05	3,20 (2,80-3,70) p>0,05	5,00 (4,10-5,80) p<0,05
Клетки после воздействия 100 мкМ NOC-5	0,30 (0,20-0,40) p>0,05	6,50 (6,10-6,60) p<0,05	3,90 (3,80-4,10) p>0,05	8,70 (8,50-8,80) p<0,05
Клетки после воздействия 500 мкМ NOC-5	0 (0-0,10) p>0,05	7,10 (6,80-7,90) p<0,05	2,70 (2,50-4,50) p>0,05	12,70 (10,30-13,00) p<0,05
Клетки после воздействия 1 мМ NOC-5	0 (0-0,10) p>0,05	11,00 (10,20-11,20) p<0,05	4,10 (4,00-4,20) p>0,05	12,90 (10,30-14,70) p<0,05
p межгрупповое	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05

Возможно, именно за счет активации данного фактора транскрипции происходит интенсификация апоптоза опухолевых клеток. YY1 представляет собой повсеместно присутствующий и мультифункциональный цинксодержащий транскрипционный фактор (известный также, как дельта фактор, NF-E1, UCRBP и CF1), член семейства белков Polycomb Group, группы homeobox генных рецепторов, способных к активации или подавлению транскрипционной активности. YY1 взаимодействует со многими элементами, вовлеченными в регуляцию клеточного цикла (p53, MDM2, циклин D1 и др.) и обычно способствует клеточной пролиферации.

YY1 также вовлечен в активацию экспрессии апоптоз-ассоциированных молекул (NF- κ B, Fas, DR5 (TRAIL рецептор) и др.) [Lee J.Y. et al., 2007].

Таблица 7.

Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими и апоптотическими признаками после 15 минутного и 24 часового воздействия различных концентраций донора оксида азота, NOC-5 Me(Q1-Q3), n=4

Условия эксперимента	Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими признаками после 15 мин инкубации, %	Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими признаками после 24 ч инкубации, %	Число мононуклеарных лейкоцитов с апоптотическим и признаками после 15 мин инкубации, %	Число мононуклеарных лейкоцитов с апоптотическими признаками после 24 ч инкубации, %
Интактные клетки	0,05 (0-0,10)	0,05 (0-0,10)	32,20 (18,80-35,40)	28,50 (24,80-29,30)
Клетки после воздействия 5 мкМ NOC-5	0 (0-0,05) p>0,05	0,60 (0,40-0,90) p>0,05	34,60 (3,10-34,90) p>0,05	25,60 (23,40-28,90) p>0,05
Клетки после воздействия 50 мкМ NOC-5	0 (0-0,05) p>0,05	0,65 (0,50-0,80) p>0,05	37,10 (35,30-38,90) p>0,05	22,50 (20,40-23,00) p>0,05
Клетки после воздействия 100 мкМ NOC-5	0 (0-0,05) p>0,05	0,40 (0,30-0,80) p>0,05	37,40 (36,80-38,30) p>0,05	23,60 (21,90-29,80) p>0,05
Клетки после воздействия 500 мкМ NOC-5	0 (0-0,05) p>0,05	0,30 (0,10-0,40) p>0,05	34,30 (32,10-36,40) p>0,05	24,50 (23,50-25,60) p>0,05
Клетки после воздействия 1 мМ NOC-5	0 (0-0,10) p>0,05	0,10 (0,0-0,20) p>0,05	34,30 (32,10-36,80) p>0,05	39,00 (28,60-42,30) p>0,05
p межгрупповое	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

В результате исследования влияния двух различных доноров оксида азота на программированную гибель клеток были получены данные, позволяющие предположить факт наличия селективного проапоптотического действия оксида азота в отношении опухолевых клеток. Данный эффект был продемонстрирован при кратковременном (15 мин) воздействии миллимолярного SNP и продолжительном (24 ч) воздействии микромолярных доз NOC-5. Наличие специфических мишеней кратковременного и более продолжительного проапоптотического действия NO убедительно доказывают роль данного вещества в регуляции

программированной гибели опухолевых клеток. Результаты, полученные с использованием различных концентраций и временных промежутков аппликации доноров оксида азота, позволяют предположить различные сценарии действия NO в зависимости от внутриклеточной концентрации.

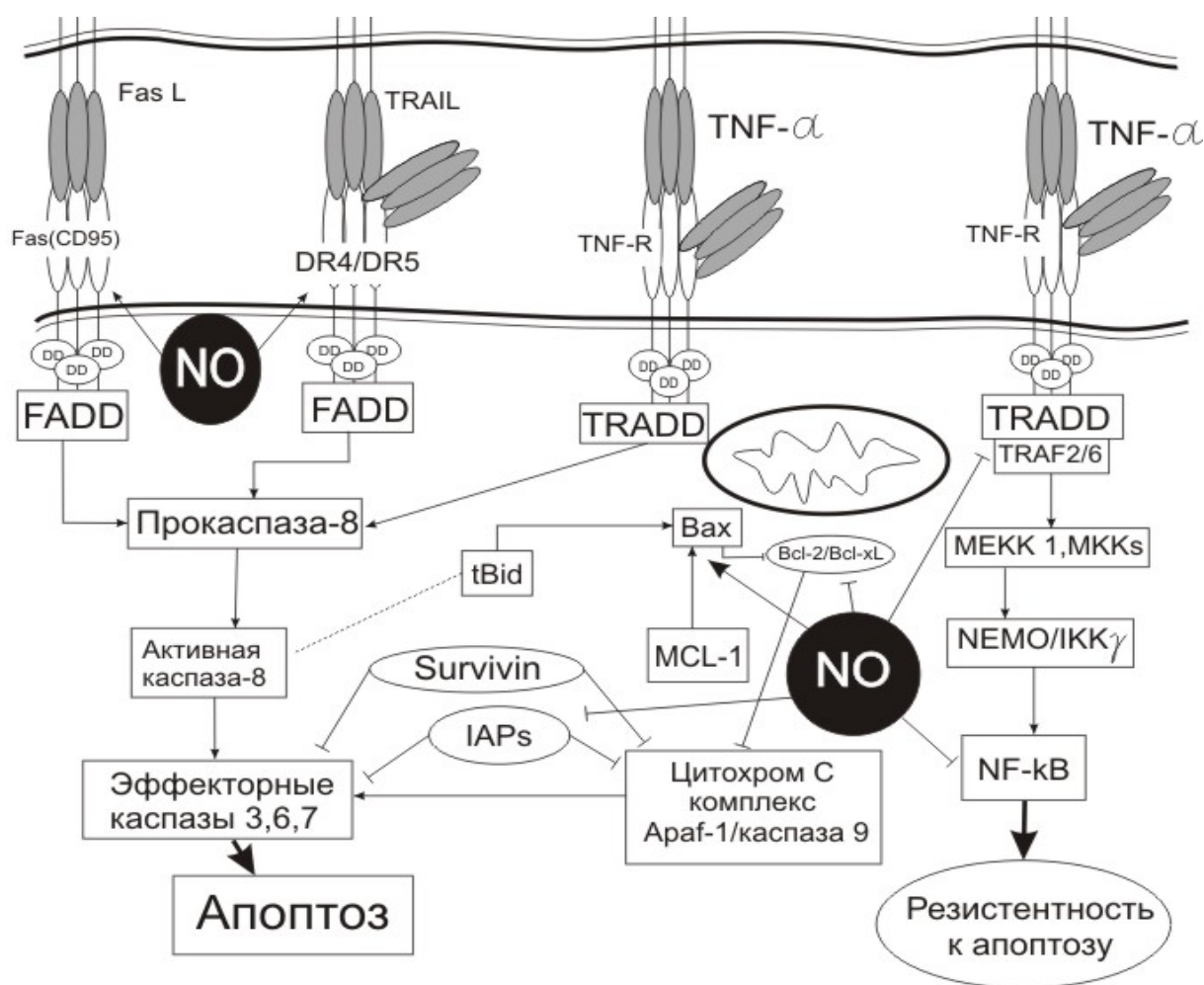


Рис. 15 Влияние оксида азота на экспрессию генов, вовлеченных в регуляцию апоптоза [по данным S.Y. Olsona, H.J. Garban, 2008]

3.2 Апоптоз клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов в ответ на воздействие донора монооксида углерода

Другой представитель группы газотрансмиттеров - оксид углерода - образуется при катаболизме гемма до CO, железа и биливердина. Данная реакция катализируется ферментом гемоксигеназой и требует затраты одной молекулы NADPH. NO экспрессируется в виде трех изоформ: NO-1, NO-2 и

НО-3. Последняя обладает наиболее низкой способностью к деградации гема. Гемоксигеназы расщепляют протогем IX с образованием биливердина-IX α , двухвалентного железа и оксида углерода. Биливердин- IX α конвертируется затем в билирубин-IX α при участии биливердин-редуктазы. НО-1 индуцируется в ответ на стрессовые воздействия, тогда как НО-2 является конститутивным ферментом. Роль открытой недавно третьей изоформы гемоксигеназы (НО-3) в деградации гема *in vivo* четко не определена, так как данный фермент обладает более высокой константой Михаэлиса к протогему IX, чем два других изоэнзима [Fang J. et al., 2003]. Показано, что гемоксигеназы экспрессируются в наибольшем количестве в четырех органах: мозге, печени, селезенке и яичках [Bach F.H., 2002].

Продукты ферментативной активности гемоксигеназ - билирубин и биливердин - являются ловушками активных форм кислорода [Alam J., 2003]. Двухвалентное железо усиливает токсичность перекиси водорода в реакции Фэнтона. С другой стороны, двухвалентное железо вызывает стабилизацию мРНК ферритина, что приводит к окислению свободных ионов железа и сохранению его в клетке. Поскольку не только СО, но и другие продукты реакции имеют важное физиологическое значение, индукция НО-1 в ответ на стрессовый стимул служит протективным механизмом при окислительном повреждении тканей [Otterbein L.E., 2002].

Работы с использованием газообразного монооксида углерода показали протективный эффект действия данного вещества на ряд клеточных линий [Otterbein L.E., 2002]. Данное свойство СО было предложено использовать в трансплантологии, когда предназначенные для трансплантации органы хранят в атмосфере, насыщенной СО. Первые упоминания о проапоптотической роли монооксида углерода относят к 2004 году. В исследованиях H.Fujimoto et al. [2004] показано, что СО активирует апоптоз опухолевых клеток. Эксперименты с использованием СО-высвобождающих молекул также продемонстрировали проапоптотический потенциал монооксида углерода. Учитывая неоднозначность данных литературы о

влиянии СО на апоптоз клеток, в данном исследовании была проведена сравнительная оценка действия CORM-2 на программированную гибель опухолевых и небласттрансформированных клеток.

Нами было показано, что инкубация клеток линии Jurkat с 50 и 100 мкМ CORM-2 в течение 15 мин не сопровождалась изменением числа некротизированных клеток относительно контроля ($p>0,05$). При этом воздействие 500 мкМ донора СО той же продолжительности приводило к увеличению числа клеток с признаками некроза ($p<0,05$). 500 мкМ концентрация CORM-2, вызывающая многократную интенсификацию некроза Jurkat клеток после суточной инкубации, не применялась нами в экспериментах с использованием мононуклеарных лейкоцитов. Наряду с этим была отмечена интенсификация некроза клеток Т-лимфобластной лейкемии после 24 ч воздействия 50 и 100 мкМ CORM-2 ($p<0,05$). Повышение числа некротически-измененных клеток при действии монооксида углерода может быть результатом развивающегося под влиянием монооксида углерода окислительного стресса [Piantodosi С.А., 2002]. При этом не известно является ли полученный эффект результатом гипоксии-реоксигенации или последствием непосредственного влияния СО на функционирование гем-содержащих белков.

Число некротически-измененных клеток оставалось на уровне контроля после 15-ти минутного воздействия на культуру мононуклеарных лейкоцитов 50 мкМ CORM-2 ($p>0,05$). Воздействие донора СО в дозе 100 мкМ приводило к увеличению числа некротизированных мононуклеарных лейкоцитов как после 15-ти минутного воздействия, так и после 24-х часовой инкубации ($p<0,05$). Нами также было отмечено возрастание числа клеток с признаками некроза после 24-х часового воздействия 50 мкМ CORM-2 относительно интактной культуры мононуклеарных лейкоцитов ($p<0,05$) (табл. 8, 9).

Воздействие CORM-2 в дозах 50, 100 и 500 мкМ в течение 15 мин и 24 ч на клетки линии Jurkat вызывало достоверное повышение количества

клеток, вступивших в апоптоз, по сравнению с таковым в интактной культуре клеток той же линии ($p < 0,05$). Следует отметить, что интенсивность апоптоза возрастала при воздействии 50 мкМ CORM-2 в 2 раза в случае 15-ти минутной инкубации и в 9 раз – в случае 24-х часовой, при воздействии 100 мкМ CORM-2 – в 1,8 раз в случае 15-ти минутного воздействия и в 37 раз – при 24-х часовом, при воздействии 500 мкМ CORM-2 – в 2,7 раз в условиях инкубации в течение 15 мин и в 1,5 раза – при суточной инкубации. Интенсификация апоптоза при действии СО может являться следствием его влияния на гем-содержащие транскрипционные факторы. Одной из специфических мишеней СО-опосредованной регуляции апоптоза является транскрипционный фактор HIF1. Экспрессия последнего увеличивается под влиянием СО, что позволяет предполагать наличие положительной обратной связи СО – HIF-1 – HO1 – СО [Wegiel B. et al., 2008].

Таблица 8

Число клеток линии Jurkat с некротическими и апоптотическими признаками после 15 минутного и 24 часового воздействия различных концентраций донора монооксида углерода CORM-2, Me(Q1-Q3), n=4

Условия эксперимента	Число клеток линии Jurkat с некротическими признаками после 15 мин инкубации, %	Число клеток линии Jurkat с некротическими признаками после 24 ч инкубации, %	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками после 15 мин инкубации, %	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками после 24 ч инкубации, %
Интактные клетки	0,35 (0,15-0,45)	0 (0-0,15)	3,50(2,70-4,20)	1,05(0-1,55)
Клетки после воздействия 50 мкМ CORM-2	0,70 (0,60-0,80) $p > 0,05$	2,10 (1,70-2,35) $p < 0,05$	7,0(5,30-8,0) $p < 0,05$	9,60 (8,90-10,10) $p < 0,05$
Клетки после воздействия 100 мкМ CORM-2	0,70 (0,50-1,00) $p > 0,05$	8,50 (7,75-9,00) $p < 0,05$	6,80(5,40-7,80) $p < 0,05$	37,30(35,80-39,60) $p < 0,05$
Клетки после воздействия 500 мкМ CORM-2	1,10 (1,00-1,20) $p < 0,05$	92,90 (90,80-96,90) $p < 0,05$	8,60(8,30-9,10) $p < 0,05$	5,40(2,70-6,90) $p < 0,05$
p межгрупповое	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$

Добавление CORM-2 в дозах 50 и 100 мкМ в культуральную среду мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, в течение 15-ти мин приводило к достоверному снижению количества аннексин-

положительных клеток до 6,17(5,45-7,00) и 12,70(9,90-15,00)%, соответственно, относительно контроля - 32,20(18,80-35,40)% ($p < 0,05$). Донор монооксида углерода в концентрации 50 мкМ не вызывал изменений числа мононуклеарных лейкоцитов после 24-х часового воздействия по сравнению с таковым в интактной культуре ($p > 0,05$). Суточная инкубация мононуклеарных лейкоцитов со 100 мкМ CORM-2 сопровождалась увеличением количества клеток, вступивших в апоптоз, до 40,30(38,10-41,50)%, по сравнению с интактной культурой [28,50(24,85-29,30) % ($p < 0,05$)] (табл. 8, 9).

В экспериментах с насыщенной СО атмосферой ранее было продемонстрировано, что монооксид углерода обладает антиапоптотическими свойствами за счет индукции NF-kB-зависимых антисуицидальных генов, препятствует деполяризации митохондрий [Zuckerbraun B. S., Billiar T. R., 2003; Queiroga C. S. et al., 2008]. При этом в экспериментах с использованием Jurkat клеток было показано, что СО усиливает клеточную смерть, активированную Fas/FasL или TRAIL лигандами [Song R. et al., 2004]. Использование СО-высвобождающих соединений (CORMs) началось сравнительно недавно. Парадоксально, но монооксид углерода, высвобождаемый из этих молекул, обладает проапоптотическим действием. Так, СО, выделяемый CORM-2, вызывает гибель эритроцитов (эритроптоз) [Lang E. et al., 2012]. I.C. Winburn et al. [2012] связывают проапоптотический эффект CORMs с цитотоксическими свойствами не монооксида углерода, а рутения, входящего в состав данных соединений.

Для проверки данного утверждения нами был использован не содержащий СО CORM-2 (iCORM-2). Однако указанное вещество не обладало проапоптотическим действием в отношении клеток линии Jurkat. Так, количество клеток с признаками апоптоза оказалось достоверно ниже при использовании 50 мкМ iCORM-2 [0,20(0,10-0,30)%] относительно такового после инкубации клеток с 50 мкМ CORM-2 [9,60(8,90-10,10)%],

($p < 0,05$)] и не отличалось от их содержания в интактных культурах клеток линии Jurkat [1,05(0,0-1,55)%, ($p > 0,05$)]. Число некротизированных клеток после воздействия 50 мкМ iCORM-2 также было сопоставимо с таковым после инкубации клеток с 50 мкМ CORM-2 ($p > 0,05$) и превышало их количество в контроле ($p < 0,05$) (табл.10).

Таблица 9

Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими и апоптотическими признаками после 15 минутного и 24 часового воздействия различных концентраций донора монооксида углерода, CORM-2 Me(Q1-Q3), n=4

Условия эксперимента	Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими признаками после 15 мин инкубации, %	Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическим и признаками после 24 ч инкубации, %	Число мононуклеарных лейкоцитов с апоптотическими признаками после 15 мин инкубации, %	Число мононуклеарных лейкоцитов с апоптотическими признаками после 24 ч инкубации, %
Интактные клетки	0,05 (0-0,1)	0,45 (0,35-0,75)	32,20 (18,80-35,40)	28,50 (24,85-29,30)
Клетки после воздействия 50 мкМ CORM-2	0,60 (0,30-0,90) $p > 0,05$	7,00 (3,25-9,50) $p < 0,05$	6,17 (5,45-7,00) $p < 0,05$	30,94 (28,62-33,47) $p > 0,05$
Клетки после воздействия 100 мкМ CORM-2	8,53 (2,25-12,30) $p < 0,05$	41,10 (39,30-42,90) $p < 0,05$	12,70 (9,90-15,00) $p < 0,05$	40,30 (38,10-41,50) $p < 0,05$
p межгрупповое	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Таким образом, для дальнейших исследований молекулярных механизмов влияния монооксида углерода на запрограммированную гибель клеток нами была выбрана концентрация CORM-2 – 50 мкМ. Применение указанной дозы характеризовалось появлением наибольшего количества апоптотических клеток без интенсификации некроза. Кроме того, 50 мкМ донор СО не вызывал увеличения числа апоптотически-измененных мононуклеарных лейкоцитов. Полученный эффект от действия CORM-2 на разные типы клеток может быть использован для патогенетически направленной коррекции дисрегуляции апоптоза при опухолевом росте. Проведенный нами эксперимент с использованием iCORM-2 подтвердил

ключевую роль монооксида углерода в активации программированной гибели клеток линии Jurkat.

Таблица 10

Число клеток линии Jurkat с некротическими и апоптотическими признаками после 24 часового воздействия 50 мкМ CORM-2 и 50 мкМ iCORM-2, Me(Q1-Q3), n=4

Условия эксперимента	Число клеток линии Jurkat с некротическими признаками после 24 ч инкубации, %	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками после 24 ч инкубации, %
Интактные клетки	0,0 (0,0-0,15)	1,05(0,0-1,55)
Клетки после воздействия 50 мкМ CORM-2	2,10 (1,70-2,35) $p_1 < 0,05$	9,60(8,90-10,10) $p_1 < 0,05$
Клетки после воздействия 50 мкМ iCORM-2	1,80(0,80-3,70) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	0,20(0,10-0,30) $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примечание: $p_1 < 0,05$ – по сравнению с интактной культурой; $p_2 < 0,05$ – по сравнению с клетками после действия CORM-2 в концентрации 50 мкМ

3.3 Апоптоз клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов в ответ на воздействие донора сульфида водорода

Последний из открытых на сегодняшний день представителей группы газотрансмиттеров - сульфид водорода - образуется в организме с участием трех ферментов цистатионин-β-синтазы (CBS), цистатионин-γ-лиазы (CSE) и 3-меркаптопируват сульфур трансферазы (3MST) с цистеин аминотрансферазой (CAT). CBS генерирует сульфид водорода из цистеина за счет реакции β-элиминации или более эффективного β-перемещения, в которых цистеин конденсируется с гомоцистеином [Chen X. et al., 2004]. В мозге CBS экспрессируется астроцитами с наибольшей концентрацией в мозжечке и гиппокампе [Enokido Y. et al., 2005; Ichinohe A. et al., 2005]. Экспрессия CBS меняется в процессе развития организма: данный фермент экспрессируется в нейроэндотелиальных клетках вентрикулярной зоны на ранних стадиях развития и в радиальных клетках и астроцитах - в позднем эмбриональном и неонатальном периодах [Enokido Y. et al., 2005]. Уровень экспрессии CBS увеличивается в реактивных астроцитах, опосредующих

нейрональное восстановление в поврежденном мозге, и индуцируется такими факторами как эпидермальный ростовой фактор (EGF), трансформирующий фактор роста (TGF- β) и циклический аденозин монофосфат (цАМФ) [Kimura H. et al., 2012].

CSE может участвовать в продукции сульфида водорода из цистеина и гомоцистеина. При физиологических условиях α -, β -элиминация цистеина приводит к образованию H_2S . При высоких концентрациях гомоцистеина при гомоцистеинемии реакции α -, γ -элиминации и γ -перемещения являются доминантными для продукции сульфида водорода с участием CSE [Chiku T. et al., 2009].

Предполагается, что активность CSE имеет высокую физиологическую значимость в гладкомышечных клетках [Zhao W. et al., 2001]. Холинергическая релаксация кровеносных сосудов значительно снижена у CSE дефицитных животных. Нокаут CSE приводит к увеличению давления крови, сопоставимому с таковым при нокаутах eNOS [Mustafa A.K. et al., 2009]. Однако эти данные весьма противоречивы и требуют дальнейшего изучения [Shibuya N. et al., 2009; Olson K.R. et al., 2010]. Так, при исследовании CSE-нокаутных мышей рядом авторов было высказано предположение о том, что потеря активности CSE не влияет на кровяное давление [Yang G., 2008; Ishii I. et al., 2010]. Полученные результаты могут быть объяснены, во первых, тем, что 3MST и CAT могут быть вовлечены в регуляцию давления крови, во-вторых, повышение образования сульфида водорода за счет 3MST и CAT может компенсировать потерю активности CSE в нокаутных животных.

Производство сульфида водорода из 3-меркаптопирувата за счет 3MST была первоначально зарегистрирована при pH=7,4. Однако максимальная активность данного фермента выявлена в щелочных условиях. CBS и CSE локализованы в цитоплазме, тогда как 3MST - в матриксе митохондрий. Активность 3MST обнаружена в нейронах мозга и сетчатке [Shibuya N. et al., 2009; Mikami Y. et al., 2011].

3-меркаптопируват продуцируется за счет САТ из цистеина и α -кетоглутарата. Концентрация цистеина в цитозоле составляет 0,15-0,25 мкМ, а в митохондриях достигает 0,70-0,99 мкМ, что может быть достаточным для продукции сульфида водорода на базальном уровне. Кроме того, глутатион, представляющий собой внутриклеточный запас цистеина, содержится в клетках в концентрациях, в десятки и сотни раз превышающих уровень цистеина, и может обеспечивать клетки данным соединением по мере необходимости. Было показано, что продукция сульфида водорода с участием 3MST/САТ пути регулируется внутриклеточным поступлением ионов кальция. Активность САТ супрессируется за счет Ca^{2+} в дозозависимой манере [Mikami Y. et al., 2011].

Сульфид водорода активирует транскрипционный фактор Nrf2 (эритроид-2-ассоциированный фактор), увеличивающий экспрессию тиоредоксина и тиоредоксинредуктазы. При этом тиоредоксин потенцирует активность 3MST с продукцией сульфида водорода, что может являться механизмом положительной обратной связи [Suh J.H. et al., 2004; Calvert J.W., 2009].

В настоящее время в литературе описаны эксперименты, в которых повышение внутриклеточного уровня сульфида водорода достигается за счет повышения экспрессии ферментов, синтезирующих данный газовый трансмисмиттер. Однако общепринятыми модуляторами содержания H_2S являются быстродиссоциирующие доноры NaHS и Na_2S . Также активно разрабатываются медленнодиссоциирующие доноры сульфида водорода (GYY4137, аналоги цистеина). При этом последние демонстрируют эффекты, нехарактерные для действия H_2S [Kashfi K., Olson K.R., 2013]. Учитывая вышеизложенные факты, в нашем исследовании в качестве донора сульфида водорода использован NaHS для изучения влияния данного газа на механизмы регуляции апоптоза и пролиферации клеток.

Данные о влиянии H_2S на механизмы реализации апоптоза клеток противоречивы: этот газотрансмисмиттер может иметь как индуцирующее, так и

ингибирующее воздействие на указанный процесс [Rinaldi L. et al., 2006; Adhikari S., Bhatia M., 2007; Baskar R., 2007]. При этом направленность апоптотической реакции при действии сульфида водорода определяется типом исследуемых клеток и дозой действующего агента. В данном исследовании была предпринята попытка оценить дозо- и время-зависимое влияние сульфида водорода на апоптоз «здоровых» и бласттрансформированных клеток.

Действие сульфида водорода в концентрациях 10, 50, 100, 500 мкМ, 10, 50, 100 и 500 мМ в течение 15-ти мин не приводило к увеличению числа клеток с признаками некроза в культуре Т-лимфобластной лейкемии и мононуклеарных лейкоцитов ($p > 0,05$). Нами было отмечено возрастание числа некротизированных Jurkat клеток и мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, после 24 ч воздействия на клетки 10, 50 и 100 и 500 мМ NaHS относительно количества их в интактной культуре ($p < 0,05$). Микромолярные дозы NaHS (10, 50, 100 и 500 мкМ) не вызывали появления клеток с признаками некроза после 24 ч инкубации в культуре мононуклеарных лейкоцитов и Jurkat клеток, по сравнению с контрольными значениями ($p > 0,05$) (табл. 11, 12).

Показано, что проапоптотический эффект сульфида водорода в высоких миллимолярных концентрациях сопровождается генерацией активных форм кислорода, снижением содержания глутатиона и вовлечением как рецепторного (Fas-опосредованного), так и митохондриального путей реализации запрограммированной клеточной гибели [Adhikari S., Bhatia M., 2007; Baskar R., 2007]. Действие более низких (милли- и микромолярные) концентраций газа может приводить к цитопротективному (антинекротическому и антиапоптотическому) или проапоптотическому эффекту в зависимости от типа клеток и условий эксперимента [Lowiska E., Beltowski J., 2007].

В проведенном нами исследовании интенсификация апоптотического процесса в культуре клеток линии Jurkat происходила при 15 мин

воздействии 10, 50 и 100 мМ NaHS ($p < 0,05$). Показано, что H_2S может запускать запрограммированную гибель клеток с вовлечением митохондриального пути индукции апоптоза, активацией каспазы 3 и семейства MAP-киназ [Adhikari S., Bhatia M., 2007]. 24-х часовая инкубация с NaHS в конечных концентрациях 10, 50 и 100 мМ также приводила к увеличению числа аннексин-положительных клеток линии Jurkat, по сравнению с количеством их в контроле ($p < 0,05$). Однако в случае 24-х часового воздействия донора сульфида водорода количество апоптотических клеток было ниже соответствующего параметра после 15-ти минутной инкубации ($p < 0,05$). Инкубация клеток линии Jurkat с 10, 50, 100 и 500 мкМ NaHS в течение 15 мин и 24 ч не приводила к изменению числа апоптотических клеток относительно их содержания в контроле ($p > 0,05$) (табл. 11).

Воздействие донора сульфида водорода в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ в течение 15 мин не влияло на запрограммированную гибель мононуклеарных лейкоцитов ($p > 0,05$). 15-ти минутное действие NaHS в миллимолярных дозах сопровождалось снижением числа апоптотически-измененных мононуклеарных лейкоцитов, по сравнению с количеством их в интактной культуре ($p < 0,05$) (табл.12).

Кроме того, нами не было отмечено изменений числа клеток с апоптотическими признаками после 24-х часовой инкубации мононуклеарных лейкоцитов с 10, 50, 100 мкМ и 10 мМ NaHS ($p > 0,05$). Число аннексин-положительных мононуклеарных лейкоцитов снижалось до 7,65(2,05-15,35)% при воздействии 50 мМ и до 1,70(0,65-8,00)% при воздействии 100 мМ донора сульфида водорода в течение 24 ч, по сравнению с контролем 28,50(24,85-29,30)% ($p < 0,05$), на фоне увеличения количества клеток с некротическими признаками (табл. 12). Одной из причин токсического влияния сульфида водорода, по данным литературы, является разобщение окислительного фосфорилирования и ингибирование функционирования митохондрий [Wang R., 2003].

Число клеток линии Jurkat с некротическими и апоптотическими признаками после 15 минутного и 24 часового воздействия различных концентраций донора сульфида водорода, Me(Q1-Q3), n=4

Условия эксперимента	Число клеток линии Jurkat с некротическими признаками после 15 мин инкубации, %	Число клеток линии Jurkat с некротическими признаками после 24 ч инкубации, %	Число клеток линии Jurkat с апоптотическим и признаками после 15 мин инкубации, %	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками после 24 ч инкубации, %
Интактные клетки	0,35 (0,15-0,45)	0 (0-0,15)	3,50 (2,70-4,20)	1,05 (0-1,55)
Клетки после воздействия 10 мкМ NaHS	0,35 (0,30-0,45) p>0,05	0 (0-0,05) p>0,05	3,50 (3,00-4,10) p>0,05	1,10 (0,90-1,20) p>0,05
Клетки после воздействия 50 мкМ NaHS	0,30 (0,20-0,35) p>0,05	0 (0-0,15) p>0,05	4,10 (3,90-4,50) p>0,05	1,50 (1,00-2,10) p>0,05
Клетки после воздействия 100 мкМ NaHS	0,45 (0,35-0,55) p>0,05	0,10 (0,05-0,25) p>0,05	3,60 (3,00-4,00) p>0,05	1,35 (0,95-1,55) p>0,05
Клетки после воздействия 500 мкМ NaHS	0,45 (0,35-0,55) p>0,05	0,15 (0,10-0,25) p>0,05	3,80 (3,50-4,20) p>0,05	1,30 (1,25-1,35) p>0,05
Клетки после воздействия 10 мМ NaHS	0,15 (0,10-0,30) p>0,05	2,30 (2,15-2,55) p<0,05	9,70 (8,83-14,90) p<0,05	3,67 (3,04-4,31) p<0,05
Клетки после воздействия 50 мМ NaHS	0,15 (0,05-0,30) p>0,05	5,60 (3,75-9,15) p<0,05	9,35 (8,75-11,20) p<0,05	5,32 (4,75-5,94) p<0,05
Клетки после воздействия 100 мМ NaHS	0,20 (0,15-0,30) p>0,05	13,30 (8,95-46,05) p<0,05	13,20 (10,00-16,80) p<0,05	5,48 (4,82-6,26) p<0,05
Клетки после воздействия 500 мМ NaHS	0,30 (0,15-0,45) p>0,05	50,60 (30,20-70,80) p<0,05	Не определялось	Не определялось
p межгрупповое	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05

Известно, что в основе опухолевой трансформации/прогрессии лежит редокс-дизрегуляция, опосредующая свое влияние за счет активации митогенных сигналов и модуляции апоптотических/пролиферативных сигнальных путей. Обычно прооксидантное отклонение в клеточном редокс-гомеостазе приводит к развитию таких фенотипических отличий опухолевых клеток, как изменения метаболизма, модуляция клеточного цикла, повышение экспрессии антиапоптотических молекул и активации

проангиогенных сигналов. Согласно мнению B.L. Predmore et al. [2012], прооксидант-индуцированное повышение внутриклеточных АФК и изменение уровня дисульфидов специфически действует на опухолевые клетки, а терапевтический индекс при действии прооксидантного агента определяется разностью редокс чувствительности нормальных и малигнизированных клеток. Возможно, зарегистрированная нами активация апоптоза опухолевых клеток при действии сульфида водорода обязана именно большей чувствительности трансформированных клеток к изменению внутриклеточного редокс баланса.

Роль активных форм кислорода и азота в развитии опухолей в настоящее время хорошо изучена [Trachootham D. et al., 2008]. Данные вещества оперируют через два основных механизма [Wondrak G.T., 2009]: во-первых, посредством модуляции экспрессии редокс-чувствительных генов, во-вторых - индукции генетических модификаций.

Сульфид водорода может играть роль окислителя. Его высокая реакционная способность и как окислителя, и как восстановителя неорганических полисульфидов наводит на мысль о возможной роли сульфида водорода как прооксидантного агента, вовлеченного в индукцию гибели опухолевых клеток [Jacob C. et al., 2008].

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

Для дальнейших исследований молекулярных механизмов влияния газовых трансмиттеров на процессы реализации апоптоза нами были выбраны следующие концентрации доноров 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). Изучение проапоптотического действия 100 мкМ NOC-5 и 50 мкМ CORM-2 в отношении опухолевых клеток интересно с точки зрения

возможности применения данных соединений в качестве патогенетически-обоснованной коррекции апоптоза, поскольку в указанных концентрациях доноры NO и CO не вызывали активацию гибели небласттрансформированных клеток.

Таблица 12

Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими и апоптотическими признаками после 15 минутного и 24 часового воздействия различных концентраций донора сульфида водорода, Me(Q1-Q3), n=4

Условия культивирования	Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими признаками после 15 мин инкубации, %	Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими признаками после 24 ч инкубации, %	Число мононуклеарных лейкоцитов с апоптотическими признаками после 15 мин инкубации, %	Число мононуклеарных лейкоцитов с апоптотическими признаками после 24 ч инкубации, %
Интактные клетки	0,05 (0-0,10)	0,45 (0,35-0,75)	32,20 (18,80-35,40)	28,50 (24,85-29,30)
Клетки после воздействия 10 мкМ NaHS	0 (0-0,20) p>0,05	0,55 (0,30-0,70) p>0,05	20,50 (15,60-22,30) p>0,05	25,20 (20,40-30,00) p>0,05
Клетки после воздействия 50 мкМ NaHS	0,1 (0-0,10) p>0,05	1,05 (0,65-1,20) p>0,05	25,40 (16,30-30,10) p>0,05	21,60 (20,50-29,50) p>0,05
Клетки после воздействия 100 мкМ NaHS	0 (0-0,10) p>0,05	1,10 (0,80-1,30) p>0,05	24,40 (23,50-26,00) p>0,05	19,80 (15,50-26,90) p>0,05
Клетки после воздействия 500 мкМ NaHS	0,10 (0-0,10) p>0,05	0,20 (0-0,60) p>0,05	18,50 (10,60-23,50) p>0,05	21,13 (19,80-22,65) p>0,05
Клетки после воздействия 10 мМ NaHS	0,05 (0-0,10) p>0,05	59,10 (46,50-73,15) p<0,05	3,45 (0,45-7,60) p<0,05	25,60 (15,25-39,05) p>0,05
Клетки после воздействия 50 мМ NaHS	0 (0-0,10) p>0,05	89,90 (78,45-97,30) p<0,05	5,15 (0,55-11,13) p<0,05	7,65 (2,05-15,35) p<0,05
Клетки после воздействия 100 мМ NaHS	0,10 (0-0,10) p>0,05	97,95 (89,60-99,05) p<0,05	5,20 (2,10-16,80) p<0,05	1,70 (0,65-8,00) p<0,05
Клетки после воздействия 500 мМ NaHS	0,15 (0,10-0,30) p>0,05	100,00 (99,98-100,00) p<0,05	Не определялось	Не определялось
Р межгрупповое	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

3.4 Молекулярные мишени, опосредующие дизрегуляцию апоптоза в опухолевых клетках

Показанное нами отсутствие апоптотической реакции мононуклеарных лейкоцитов на воздействие доноров газовых трансммиттеров определяется состоянием внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за регуляцию апоптоза. Для идентификации возможных точек днйствия газотрансммиттеров нами был проведен сравнительный анализ ключевых регуляторных молекул реализации программированной гибели клеток в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, и в опухолевых клетках линии Jurkat.

Дисбаланс белков семейства Bcl-2 наблюдается во многих случаях опухолевой трансформации клеток [Hajra K.M., Liu J.R., 2004; Reagan-Shaw S. et al., 2008; Yip K.W., Reed J.C., 2008]. Нами было показано, что в опухолевых клетках линии Jurkat повышено содержание белка Bcl-2 по сравнению с уровнем его в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров [2,17(1,87-2,48) и 0,59(0,48-0,67), соответственно, ($p<0,05$)]. Уровень протеинов Bad и Bcl-X_L в клетках Т-лимфобластной лейкемии был сопоставим с таковым в «здоровых» клетках [10,21(7,72-12,700 и 10,34(8,28-10,53) усл.ед., соответственно, ($p>0,05$)]. При этом экспрессия соответствующих генов (bcl-2, bcl-X_L, bad) в клетках линии Jurkat [5,84(5,35-6,12), 9,92(9,76-13,33) и 3,10(3,0-3,40) усл.ед., соответственно] достоверно превышала аналогичные параметры в мононуклеарных лейкоцитах [2,36(2,15-2,41), 1,40(1,2103,65) и 1,30(0,89-1,92) усл.ед., соответственно] ($p<0,05$). Модификация генетической экспрессии может являться ключевым патогенетическим механизмом, ответственным за разницу в апоптотическом ответе «здоровых» и опухолевых клеток при воздействии доноров газотрансммиттеров.

Поскольку белки семейства Bcl-2 влияют на реализацию апоптоза посредством регуляции проницаемости митохондриальных мембран, нами

был изучен параметр, характеризующий проницаемость мембран данных органелл, митохондриальный трансмембранный потенциал. Последний был достоверно снижен в клетках Т-лимфобластной лейкемии, по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров [1,10(0,70-1,20) и 5,60(5,30-6,90)%, соответственно, ($p<0,05$)]. Причиной более стабильного состояния митохондриальных мембран опухолевых клеток может являться зарегистрированное нами повышение уровня белка Bcl-2.

Помимо митохондриального пути, апоптоз может быть активирован посредством запуска рецепторного варианта. Анализ способности клеток презентировать на плазматической мембране TNF-R1 не выявил достоверных различий процентного содержания TNFR1-положительных клеток в культуре Т-лимфобластной лейкемии по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров [2,00(1,35-2,45) и 2,01(0,91-3,04)%, соответственно, ($p>0,05$)]. При этом оценка содержания TNF α в супернатантах культуры клеток линии Jurkat продемонстрировала снижение значений данного показателя относительно мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови у здоровых доноров [11,7(10,8-12,4) и 885,4(707,9-995,4) пг/мл, соответственно, ($p<0,05$)]. Возможно, газы могут изменять содержание рецептора и соответствующего лиганда в пользу активации апоптоза.

Еще одной точкой приложения действия газотрансмиттеров могут быть белки-ингибиторы активности каспаз. Нами было показано, что содержание протеинов XIAP и Aven в опухолевых клетках линии Jurkat [15,57(14,29-16,84) и 1,51(1,43-1,59) усл.ед., соответственно] достоверно превышает таковое в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров [8,97(7,20-11,30) и 0,04(0,02-0,08) усл.ед., соответственно] ($p<0,05$).

Таким образом, отсутствие реакции со стороны апоптотической программы мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови здоровых доноров, по сравнению с активацией апоптоза опухолевых клеток в ответ на действие газотрансмиттеров определяется разницей в балансе про- и

антиапоптотических регуляторных молекул. Исследование молекулярных механизмов реализации суицидальной программы бласттрансформированных клеток при воздействии доноров газов позволит определить пути оперирования данных молекул при опухолевой трансформации клеток.

Глава 4. Молекулярные механизмы участия газовых транасмиттеров в дизрегуляции апоптоза и пролиферации опухолевых клеток

4.1 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; М-фаза представляет собой митотическое деление клеток.

Прогрессия клеточного цикла эукариотических клеток регулируется за счет циклин-зависимых киназ (Cdks). Регуляторными единицами Cdk4/Cdk6 и Cdk2 являются циклины D-типа (D1, D2 D3) и циклин E, соответственно. Активация G_1 -специфических циклин-зависимых киназ приводит к запуску S-фазы клеточного цикла. ЦиклинD/Cdk4-Cdk6 активируются в середине G_1 -фазы и предшествуют активации Cdk2/циклин E. В условиях, благоприятствующих пролиферации, фосфорилирование Rb за счет Cdk в течение G_1 -фазы приводит к высвобождению E2F и других Rb-связанных транскрипционных факторов, которые активируют транскрипцию генов S-фазы. Уровень циклинов изменяется в различные фазы клеточного цикла, а их присутствие контролирует активность циклин-зависимых киназ и клеточную пролиферацию [Mitnacht S., Bosshof C., 2000; Aleem E. et al., 2005]. Циклины являются активаторами Cdks. При этом существуют две группы протеинов, ингибирующих активность данных ферментов. Представители первого семейства Cip/Kip (CDK inhibitory protein) - p21, p27 и p57 -ингибируют Cdk2 и Cdk4/6 циклиновые комплексы, осуществляя G_1 и G_1 /S контроль. Представители второго семейства INK4 (inhibitor of kinase 4) - p15, p16, p18 и p19 - узкоспецифичны для CDK4/6-циклин D комплексов и

осуществляют аналогичные функции. Таким образом, деление клетки находится под сложным контролем систем позитивных и негативных регуляторов. В процессе эволюции были выработаны механизмы, направленные на сохранение генетической стабильности и поддержание равновесия между действием двух вышеуказанных механизмов. Нарушения этого равновесия являются причиной развития патологических процессов, сопровождающих злокачественный рост [Залетаев Д.В. и др., 2005].

Касательно влияния внутриклеточных газовых трансммиттеров на молекулярные механизмы прогрессии клеточного цикла, известно, что NO проявляет антипролиферативное действие в отношении прекурсоров нервных клеток, а также клеток опухолей мозга и солидных опухолей [Yasuda H, 2008; Peña-Altamira E, Petazzi P, 2010]. Монооксид углерода способен уменьшать экспрессию циклина D1, возможно, за счет АФК-зависимых механизмов [Taille C. et al, 2005]. M. Chattopadhyay et al. [2012] показали, что H₂S-высвобождающие нестероидные противовоспалительные агенты эффективно ингибируют рост 11-ти различных опухолевых клеточных линий за счет ареста G₀/G₁-фазы клеточного цикла.

Поскольку донор монооксида углерода в концентрации 50 мкМ вызывал появление наименьшего количества некротизированных клеток, данная доза CORM-2 использовалась нами для изучения роли СО в регуляции клеточного цикла. Нами были выбраны 4-х и 24-х часовые временные промежутки инкубации клеток линии Jurkat с CORM-2, по истечению которых клетки подвергались проточной лазерной цитометрии.

При анализе распределения интактных клеток линии Jurkat по фазам клеточного цикла было продемонстрировано, что, спустя четыре часа после пересева, в G₁-фазе клеточного цикла находились 63,93(62,63-65,24)% клеток, в S-периоде - 21,73(19,24-22,90)% и G₂-периоде -14,97(14,48-15,55)% (табл.13).

Распределение клеток линии Jurkat по фазам клеточного цикла под воздействием донора монооксида углерода, 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, 4 ч	63,93 (62,63-65,24)	21,73 (19,24-22,90)	14,97 (14,48-15,55)
Клетки после воздействия 50 мкМ CORM-2, 4 ч	67,28 (66,09-68,18) $p_1 < 0,05$	14,98 (14,93-15,00) $p_1 < 0,05$	16,95 (14,82-18,98) $p_1 > 0,05$
Интактные клетки, 24 ч	55,53 (55,35-55,78) $p_1 < 0,05$	31,97 (31,57-32,19) $p_1 < 0,05$	14,41 (13,76-15,72) $p_1 > 0,05$
Клетки после воздействия 50 мкМ CORM-2, 24 ч	64,33 (62,27-68,66) $p_2 < 0,05$	15,39 (15,02-16,00) $p_2 < 0,05$	17,49 (15,00-19,34) $p_2 > 0,05$

Примечание: $p_1 < 0,05$ – по сравнению с интактными клетками линии Jurkat после 4 ч инкубации; $p_2 < 0,05$ – по сравнению с интактными клетками линии Jurkat после 24 ч инкубации

G₁-фаза является критическим периодом клеточного цикла, когда позитивные и негативные сигналы могут вмешиваться в его регуляцию. Внеклеточные сигналы влияют на пролиферацию до прохождения клеткой точки рестрикции (R), после которой клетка обречена на один раунд деления. Если клетка не получает митогенного стимула во время G₁-фазы, она остается в фазе покоя G₀. Наличие клеток в S-фазе клеточного цикла позволяет сделать вывод о том, что клетки в культуре получают достаточное количество митогенных сигналов и проходят R точку [Evan G. I., Vousden K.H., 2001].

Совместное культивирование клеток линии Jurkat с донором монооксида углерода CORM-2 в течение четырех часов сопровождалось увеличением количества клеток в G₁-фазе цикла за счет их уменьшения в S фазе, по сравнению с аналогичными значениями в интактной культуре ($p < 0,05$). Количество клеток в G₂-фазе после 4-х ч воздействия донора CO не отличалось от такового в интактной культуре клеток линии Jurkat ($p > 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что под влиянием монооксида

углерода увеличивается продолжительность G_1 -фазы клеточного цикла (табл. 13).

Проверка правильности прогрессии клеточного цикла осуществляется в нескольких его точках, получивших название сверочных (checkpoint). Данные участки расположены в концах G_1 , G_2 и М фаз. В первой точке осуществляется проверка наличия повреждений ДНК, во второй - наряду с повреждениями ДНК, проверяется завершенность репликации, в третьей - тестируется правильность расхождения хромосом в митозе. Если обнаруживается какое-либо из вышеперечисленных нарушений, то происходит остановка клеточного цикла, что дает время для их исправления [Kasten M., Bartek J., 2004]. Полученные нами данные об увеличении числа клеток в G_1 -фазе при действии на них донора монооксида углерода свидетельствуют о том, что СО может обладать генотоксическим эффектом, и задержка клеток в G_1 необходима для устранения полученных дефектов.

После суток инкубации интактных клеток линии Jurkat в полной питательной среде 55,53(55,35-55,78)% клетки оставались в G_1 фазе клеточного цикла; 31,97(31,57-32,19)% клеток вступали в фазу синтеза и 14,41(13,76-15,72)% - были готовы начать митоз. Сравнение указанных данных с аналогичными параметрами после 4 ч инкубации позволило сделать вывод об укорочении G_1 -фазы клеточного цикла (табл.13). Показано, что опухолевые клетки способны вырабатывать вещества, способствующих пролиферации. Возможно, указанные ауто- и паракринные механизмы позволяют клеткам линии Jurkat укорачивать период G_1 -фазы.

Воздействие СО-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 со значениями аналогичного параметра в контроле ($p < 0,05$). Количество клеток в G_2 -фазе клеточного цикла не отличалось от контрольных значений ($p > 0,05$) (табл. 13). Таким образом, под влиянием монооксида углерода в клетках удлиняется G_1 -фаза. Задержка

клеток в G_1 -фазе клеточного цикла свидетельствует об антипролиферативном влиянии CO.

Поскольку донор монооксида углерода вызывал более значительное, по сравнению с контролем, перераспределение клеток по фазам клеточного цикла после 24 ч инкубации, именно этот временной промежуток оценивался нами в дальнейшем для определения роли оксида азота и сульфида водорода в регуляции клеточного цикла.

Совместное культивирование клеток линии Jurkat с 50 и 100 мкМ донором оксида азота NOC-5 проводилось в течение 24 ч. Содержание клеток в G_1 -, S- и G_2 -фазах после инкубации с 50 мкМ донора оксида азота не отличалось от аналогичного значения в интактной культуре ($p > 0,05$). Исходя из полученных нами данных, можно сделать вывод о том, что данный вид воздействия - 50 мкМ NOC-5 в течение 24 ч - не приводит к изменению продолжительности фаз клеточного цикла (табл.14). Вероятно, используемая концентрация донора оксида азота не влияет на молекулярные механизмы пролиферации клеток.

При увеличении концентрации донора оксида азота в 2 раза (100 мкМ) *in vitro* после 24 ч воздействия было отмечено статистически значимое увеличение числа клеток, находящихся в G_1 -фазе клеточного цикла, и уменьшение количества Т-лимфобластных лейкоцитов в S-фазе клеточного цикла ($p < 0,05$). Число клеток в G_2 -фазе не изменилось в культурах, подвергшихся воздействию 100 мкМ NOC-5, по сравнению с таковым в контроле ($p > 0,05$) (табл.14). Данные результаты можно интерпретировать как достоверное увеличение продолжительности G_1 -фазы клеточного цикла после суточного воздействия 100 мкМ донора оксида азота NOC-5.

Для определения роли сульфида водорода в распределении клеток по фазам клеточного цикла нами использовались 50, 500 мкМ, 1 и 10 мМ концентрации NaHS. Число клеток, находящихся в G_1 -фазе клеточного цикла, возрастало в случае воздействия на культуру Т-лимфобластной лейкемии 50 мкМ и 10 мМ донора сульфида, по сравнению с количеством их

в контроле ($p < 0,05$). При этом выявлялось уменьшение числа клеток в S фазе клеточного цикла до 18,53(17,89-21,74)% при воздействии на клетки 50 мкМ NaHS и до 20,63(19,04-22,90)% в случае действия 10 мМ донора сульфида водорода относительно количества их в контроле 31,97(31,57-32,19)% ($p < 0,05$). 24-х часовая инкубация клеток с 50 мкМ и 10 мМ NaHS 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 контроле после воздействия 500 мкМ NaHS и 1мМ донора сульфида водорода ($p > 0,05$) (табл.15). Полученные результаты позволили предположить, что в основе антипролиферативного действия 50 мкМ и 10 мМ сульфида водорода лежат разные молекулярные механизмы. Для подтверждения данной гипотезы необходимы дальнейшие исследования.

Таблица 14

Распределение клеток линии Jurkat по фазам клеточного цикла под воздействием различных концентраций оксида азота, 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, 24 ч	55,53 (55,35-55,78)	31,97 (31,57-32,19)	14,41 (13,76-15,72)
Клетки после воздействия 50 мкМ NOC-5, 24 ч	58,26 (55,35-61,17) $p > 0,05$	27,42 (25,94-31,48) $p > 0,05$	15,13 (13,62-17,02) $p > 0,05$
Клетки после воздействия 100 мкМ NOC-5, 24 ч	64,15 (63,17-65,94) $p < 0,05$	19,81 (18,43-20,97) $p < 0,05$	14,41 (13,75-15,21) $p > 0,05$

Таким образом, реализация данного фрагмента диссертационного исследования позволила установить, что газовые транмиттеры оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода обладают антипролиферативным действием в отношении клеток линии Jurkat, проявляющимся в удлинении G₁-фазы клеточного цикла. Причиной остановки клеток в данной фазе могут являться как специфические механизмы (снижение содержания циклинов,

увеличение содержания белков-ингибиторов), так и неспецифические механизмы, активирующиеся в ответ на повреждение ДНК. Оценка экспрессии и содержания белков, контролирующих G₁-фазу клеточного цикла, необходима для выяснения механизмов антипролиферативного действия газовых трансммиттеров.

Таблица 15

Распределение клеток линии Jurkat по фазам клеточного цикла под воздействием различных концентраций донора сульфида водорода, 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, 24 ч	55,53 (55,35-55,78)	31,97 (31,57-32,19)	14,41 (13,76-15,72)
Клетки после воздействия 50 мкМ NaHS, 24 ч	65,28(63,96-67,42) p<0,05	18,53(17,89-21,74) p<0,05	15,06(14,35-16,70) p>0,05
Клетки после воздействия 500 мкМ NaHS, 24 ч	56,20(55,27-56,94) p>0,05	28,75(27,59-29,97) p>0,05	15,53(14,78-16,04) p>0,05
Клетки после воздействия 1 мМ NaHS, 24 ч	55,03(54,72-55,96) p>0,05	31,06(30,51-32,15) p>0,05	14,52(14,01-15,12) p>0,05
Клетки после воздействия 10 мМ NaHS, 24 ч	63,12(61,71-65,26) p<0,05	20,63(19,04-22,90) p<0,05	15,87(15,12-16,84) p>0,05

4. 2 Участие редокс-сигналикации в опосредуемой газами дизрегуляции апоптоза и клеточного цикла в опухолевых клетках

4.2.1 Особенности генерация активных форм кислорода при воздействии на клетки доноров газов

Одним из уникальных свойств газовых посредников является молекулярный механизм, за счет которого данные вещества участвуют во внутриклеточной сигнальной трансдукции.

Классические мессенджеры передают сигнал по принципу каскада. Так, гормоны и нейротрансммиттеры воздействуют на G-протеин-связанные

рецепторы (GPCRs), вызывая изменения G-протеинов, которые затем реагируют с ферментами, генерирующими циклические нуклеотиды или инозитол 1,4,5-трифосфат (IP3). Циклические нуклеотиды воздействуют на различные протеин киназы, IP3 вызывает высвобождение ионов кальция, что приводит к изменению активности различных внутриклеточных протеинов. Белки, действующие через тирозинкиназные рецепторы, вызывают различные, но одинаково продолжительные последовательности молекулярных событий.

Газовые мессенджеры химически модифицируют внутриклеточные протеины, изменяя клеточный метаболизм более быстрым способом. Поскольку 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.

В микромолярных концентрациях АФК способны участвовать в регуляции различных клеточных функций, таких как пролиферация, синтез гормонов, хемотаксис, «окислительный взрыв», агрегация, апоптоз и др. [Ляхович В.В. и соавт., 2005; Инжутова А.И., Салмина А.Б., 2007]. Показано, что АФК обладают свойством усиливать рост многих типов клеток млекопитающих, а антиоксиданты, напротив, - подавлять нормальную клеточную пролиферацию. В то же время увеличение продукции АФК в легких может индуцировать апоптоз пневмоцитов II типа, но при этом усиливать пролиферацию фибробластов, что является одной из причин фиброза легких [Wenger R.H., 2000; Peers C., Kemp P.J., 2001]. Примером жизненно важной регуляторной роли кислородных радикалов является NO-радикал, способный изменять сосудистый тонус. Установлено участие окислительного регулирования транскрипции генов в усилении синтеза гемоглобина [Zhu H., Bunn H.F., 2001]. Получены данные в пользу участия перекиси водорода в сигнальной трансдукции тромбоцитарного фактора

роста (PDGF) и трансформирующего фактора роста (TGF- β 1) [Mikkelsen R.B., Wardman P., 2003]. Показано, что ОН-радикал, генерируемый в реакции Фентона, является фактором, усиливающим клеточную пролиферацию и активность митоген-активируемых протеинкиназ [Дубинина Е.Е., 2001].

Однако, благодаря высокой реакционной способности, АФК вызывают окислительную модификацию биополимеров: белков, липидов, нуклеиновых кислот и углеводов. Повреждения ДНК (окисление оснований, их модификации, разрывы хромосом и отдельных цепей) приводят к злокачественному перерождению клеток или их гибели. Окислительное модифицирование белков, вызванное АФК, затрагивает аминокислотные остатки, третичную структуру, вызывает агрегацию и денатурацию белков, что приводит к нарушению или исчезновению многообразной функциональной активности протеинов (ферментативной, регуляторной, участию в матричных синтезах, транспорте ионов и липидов). Наряду с этим перекисное окисление липидов повреждает клеточные мембраны.

Все описанные нарушения могут частично или полностью изменять функционирование клеток и организма в целом, утяжелять или вызывать развитие серьезных болезней (злокачественные новообразования, острое и хроническое воспаление, сахарный диабет, атеросклероз, нейродегенеративные заболевания и др.) [Барсель В.А., и соавт., 1998; Ланкин В.З. и соавт., 2004].

Нами была предпринята попытка оценить продукцию активных форм кислорода после воздействия на клетки линии Jurkat доноров газов оксида азота, сульфида водорода и монооксида углерода.

В интактных клетках линии Jurkat уровень АФК составил 563,0(499,5-585,0) усл.ед. (табл.16). Инкубация клеток со 100 мМ SNP приводила к возрастанию уровня наработки АФК, по сравнению с аналогичным показателем в контроле ($p < 0,05$). Показано, что воздействие оксида азота приводит к разобщению окислительного фосфорилирования на уровне цитохром оксидазы, увеличению количества супероксид аниона и к

синтезу пероксинитрита при взаимодействии NO с супероксидом [Pacher et al., 2007]. Поскольку супероксид анион является короткоживущей молекулой и продуцируется в гидрофильных участках клетки, подобная реакция может происходить только в водных внутриклеточных компартментах [Korpenol W.H., 1999]:

- 1) $O_2^{\cdot-} + NO \rightarrow ONOO^{\cdot-}$;
- 2) $ONOO^{\cdot-} + 2NO \rightarrow N_2O_3 + NO_2^{\cdot-}$.

Далее пероксинитрит реагирует с CO_2 , что сопровождается генерацией аниона $ONOOCO_2^{\cdot-}$ (реакция 3). Последний распадается в течение 15 мс на комплекс NO_2/CO_3 (реакция 4).

- 3) $ONOO^{\cdot-} + CO_2 \rightarrow ONOOCO_2^{\cdot-}$;
- 4) $ONOOCO_2^{\cdot-} \rightarrow NO_2/CO_3$.

Способность диффундировать определяет возможность участия образующихся активных форм азота в клеточной сигнальной трансдукции. $ONOOCO_2^{\cdot-}$ не может мигрировать или преодолевать мембраны, благодаря анионным свойствам и короткому периоду существования. Реакционную способность N_2O_3 ограничивает гидролиз до нитрита, занимающий около 1 мс. В цитоплазме жизнь N_2O_3 еще более сокращается за счет взаимодействия с глутатионом (1-10 мМ) с формированием GSNO. В мембранах клетки, где ограничено присутствие нуклеофилов и воды, данная активная форма азота имеет больший период существования, что увеличивает вероятность ее взаимодействия со специфическими молекулярными мишенями [Janssen-Heininger Y.M. et al., 2008].

Таким образом, зарегистрированное нами увеличение продукции АФК свидетельствует о возникновении состояния окислительного/нитрозилирующего стресса в условиях воздействия на клетки 100 мМ SNP. Данное состояние поддерживается в клетках при инкубации со 100 мкМ NOC-5, о чем свидетельствовало зарегистрированное нами увеличение содержания АФК при воздействии на клетки донора данного газа ($p < 0,05$). Известно, что оксид азота (IV), образующийся при

взаимодействии NO с супероксид анионом, не подвергается гидролизу в водной среде и может длительное время присутствовать в клетке. Возможно, выявленное нами повышение продукции АФК при действии 100 мкМ NOC-5 является результатом присутствия в клетке данного окислителя.

15-ти минутное воздействие на клетки 10 mM NaHS 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. Сульфид водорода предохраняет клетки от окислительного стресса, даже, при применении после инсульта [Kimura Y., Kimura H., 2004]. Ферменты синтеза H_2S 3MST и CAT локализуются в митохондриях, представляющих собой органеллу с огромным потенциалом продукции активных форм кислорода. Сульфид водорода, продуцируемый в митохондриях, может напрямую ингибировать окислительный стресс в данных органеллах. Так, клетки линии Neuro2a, экспрессирующие 3MST и CAT, обладают значительной резистентностью к окислительному стрессу [Kimura H. et al., 2010].

Однако в нашем исследовании применение NaHS в сверхвысокой (10 mM) концентрации могло являться причиной нарушения митохондриального дыхания и увеличения уровня АФК. Нами было зарегистрировано возрастание уровня АФК относительно такового в контроле при инкубации клеток с 50 мкМ CORM-2 ($p < 0,05$). Суточная инкубация клеток с 50 мкМ NaHS не приводила к изменению уровня АФК относительно такового в контроле ($p > 0,05$) (табл.16). Поскольку увеличение продукции АФК может иметь непродолжительный характер и нивелироваться запуском антиоксидантных систем, отсутствие повышения данного показателя в случае 50 мкМ NaHS может быть обусловлено неадекватно выбранным временем его измерения.

Кроме того, зарегистрированное нами повышение уровня АФК при действии доноров NO, CO и H_2S может быть недостаточным для изменения

клеточного метаболизма. Ряд молекул, таких как транскрипционные факторы p53 и HIF-1, являются «биологическими маркерами», свидетельствующими о запуске редокс-сигналикации.

Так, возрастание уровня АФК, приводящее к изменению клеточной жизнедеятельности, должно сопровождаться активацией редокс-чувствительного транскрипционного фактора p53. Воздействие доноров оксида азота (100 мМ) и сульфида водорода (10 мМ) в течение 15 мин приводило к увеличению внутриклеточного уровня белка p53, определенного методом иммуноблоттинга, до 16,87(15,20-18,43) и 13,90(11,50-14,65) усл.ед., соответственно, по сравнению с контролем 12,69(9,81-13,86) усл.ед. ($p < 0,05$).

Таким образом, повышение уровня АФК при действии SNP и NaHS приводит к активации редокс-чувствительного транскрипционного фактора p53. Однако зарегистрированное нами повышение внутриклеточного содержания АФК при 24-х часовой инкубации клеток с NOC-5 и CORM-2 не сопровождалось увеличением уровня p53 в клетках. Так, уровень p53 снижался после воздействия на клетки 100 мкМ NOC-5 и 50 мкМ CORM-2 до 6,42(4,64-9,63) и 7,30(6,00-9,80) усл.ед., соответственно, по сравнению со значениями аналогичного параметра в интактных клетках ($p < 0,05$) (рис.16). 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 воздействия на них доноров NOC-5 и CORM-2, несмотря на высокий уровень внутриклеточной продукции АФК, может быть обусловлено, на наш взгляд, образованием комплекса p53-MDM2 в результате более продолжительной экспозиции, по сравнению с клетками, инкубированными с SNP и 10 мМ NaHS. Донор сульфида водорода в концентрации 50 мкМ также приводил к снижению уровня p53 относительно контроля ($p < 0,05$). Полученный результат может быть объяснен как отсутствием активационного стимула (нами не было отмечено возрастания продукции АФК под влиянием данной

концентрации NaHS), так и связыванием p53 с MDM2. В данном случае заключение об эффективной транскрипционной активности p53 может быть получено при измерении ответа генов–мишеней указанного фактора транскрипции.

Таблица 16

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

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

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

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 воздействии на клетки 10 мМ SNP и 100 мкМ NOC-5 ($p < 0,05$). Это подтверждает нашу теорию о том, что снижение содержания p53 при инкубации клеток с NOC-5 обусловлено связыванием данного транскрипционного фактора с молекулой-ингибитором. Однако воздействие 50 мкМ CORM-2 и 10 мМ NaHS не приводило к изменению значений показателя экспрессии bax относительно аналогичного параметра в интактных клетках ($p > 0,05$) (табл. 23).

Данные литературы убедительно свидетельствуют о том, что структура p53 может значительно различаться в зависимости от

активирующего стимула. Данный факт объясняет, почему гамма-излучение, в сравнении с УФ-радиацией, индуцирует различные гены-мишени в одних и тех же клеточных линиях [Zhao R. et al., 2000].

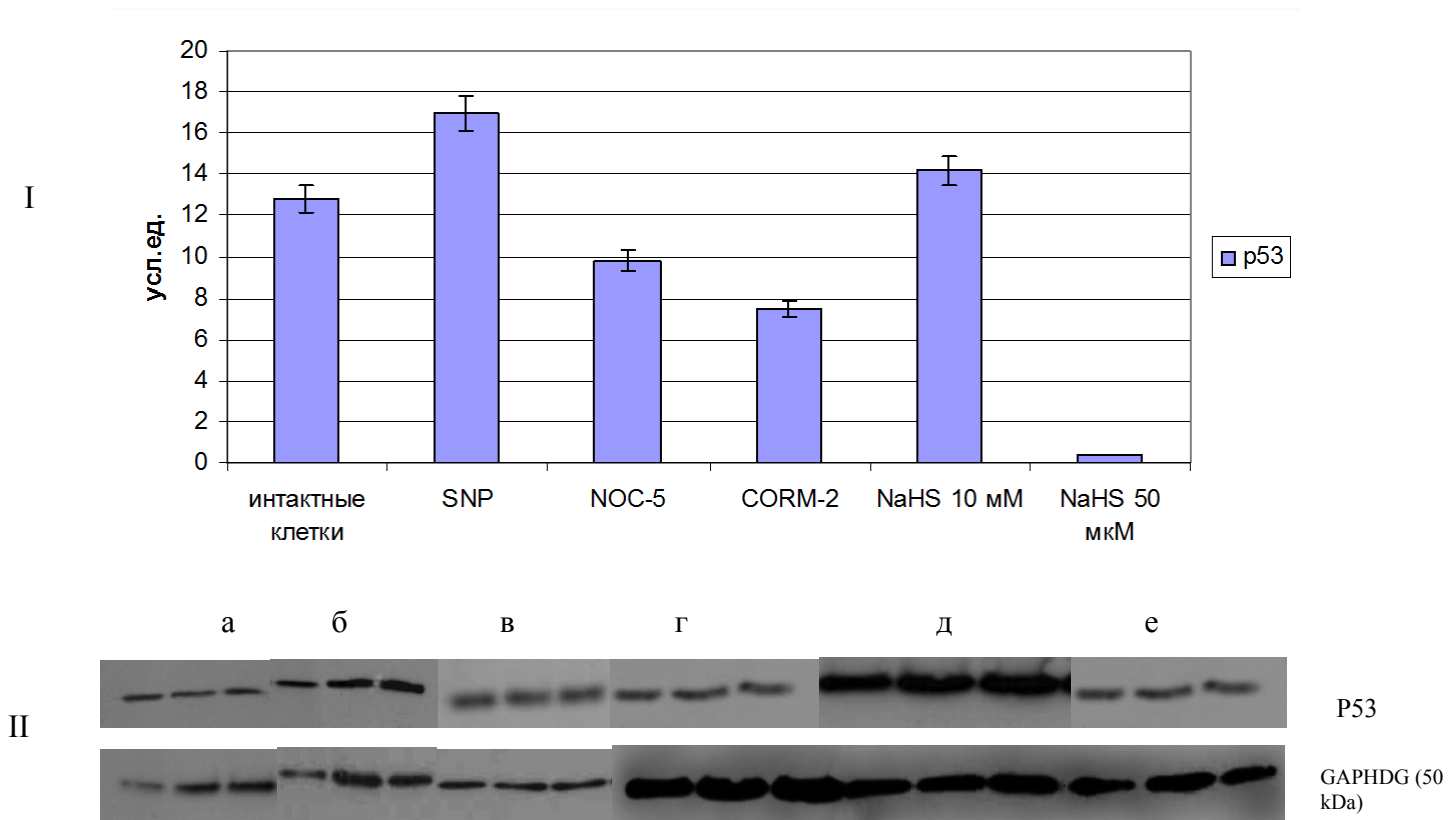


Рис.16. Уровень транскрипционного фактора p53 после воздействия на клетки доноров газов: I – уровень транскрипционного фактора p53 в клетках линии Jurkat после воздействия доноров газов, (Me(Q₁-Q₃)); II – результаты вестерн блот анализа белка p53: а – интактные клетки линии Jurkat; б – клетки после воздействия SNP; в – клетки после воздействия NOC-5; г – клетки после воздействия CORM-2; д – клетки после воздействия 10 mM NaHS; е – клетки после воздействия 50 мкМ NaHS.

Предполагается, что определенные стимулы (УФ-радиация, лекарственные вещества) приводят к различной посттрансляционной модификации p53. Действительно, молекулы p53 с разной структурой могут предпочитать различные промотеры или рекрутировать соответствующие транскрипционные коактиваторы [Krasikova M. et al., 2013]. Возможно, для активации транскрипции гена *baх* посредством p53 необходимо присутствие компонентов нитрозилирующего стресса. Для выяснения вклада АФК в p53-опосредованное изменение экспрессии генов при действии газов нами была изучена еще одна транскрипционная мишень p53 – ген, кодирующий белок

p21. Промотор гена p21 содержит p53-связывающий сайт, который позволяет p53 транскрипционно активировать указанный ген.

При инкубации клеточной культуры с донорами оксида азота SNP и NOC-5 отмечалось достоверное повышение уровня экспрессии гена p21, по сравнению с интактными клетками ($p < 0,05$). Воздействие на клетки донора монооксида углерода и 10 mM сульфида водорода также приводило к достоверному увеличению уровня экспрессии p21, по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Уровень экспрессии мРНК p21 не отличался от такового в интактных клетках после воздействия на клеточную культуру 50 мкМ NaHS ($p > 0,05$).

Таким образом, нами было продемонстрировано, что доноры газов NO (100 mM SNP и 100 мкМ NOC-5), H₂S (10 mM 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 (рис.17). Вместе с тем, выявленный факт позволяет предполагать, что проапоптотическое и антипролиферативное действие внутриклеточных газовых транмиттеров частично/полностью обусловлено сигнальными свойствами АФК. Дальнейшие исследования, проводимые в рамках настоящей работы, были направлены на идентификацию специфических и АФК-зависимых мишеней действия газовых транмиттеров. Вместе с тем следует отметить, что донор сульфида водорода в концентрации 50 мкМ не вызывал увеличения АФК продукции, что свидетельствовало о незаинтересованности редокс-зависимых сигнальных механизмов в регуляции клеточного цикла в случае воздействия на клетки NaHS в концентрации 50 мкМ.

4.2.2 Роль p38 MAPK в опосредованной газовыми транмиттерами дизрегуляции апоптоза и пролиферации клеток линии Jurkat

Митоген-активируемые протеинкиназы представляют собой семейство ферментов, играющих важную роль в регуляции метаболизма,

экспрессии генов и росте клеток. В отличие от классических MAPK и группы Erk (протеинкиназа, регулируемая внеклеточными стимулами), стресс-активируемые киназы SAPK/JNK и p38 MAPK индуцируются в основном такими раздражителями как воспалительные цитокины (IL-1, TNF- α), протеины теплового шока, ультрафиолетовое излучение, осмотический шок, метаболические яды и т.д. Ранее в нашей лаборатории были получены убедительные доказательства участия активных форм кислорода в активации p38 MAPK [Рязанцева Н.В. и др., 2009].

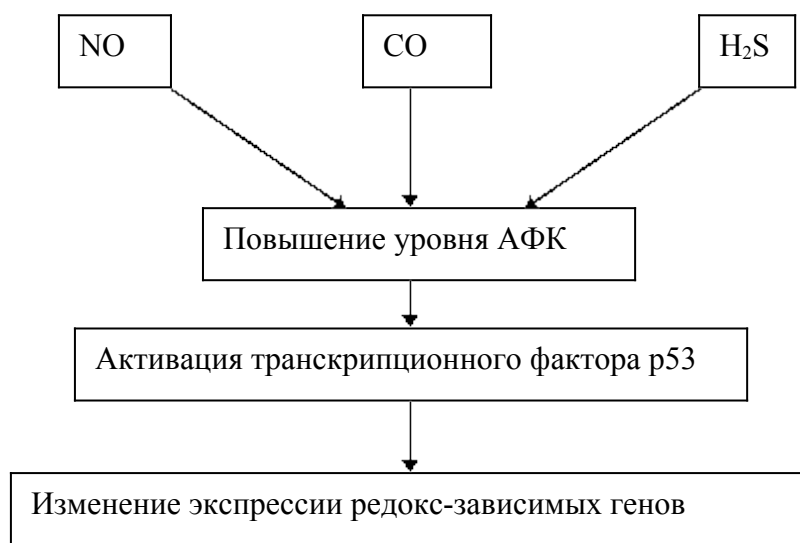


Рис.17 Активация редокс-чувствительных сигнальных систем при действии на клетки линии Jurkat доноров газов

Поскольку все вышеперечисленные воздействия в большинстве случаев приводят к гибели клеток, существует мнение, что p38 MAPK опосредует клеточную смерть [Rincon V., Flavell R.A., 2000; De Zutter G.S., Davis R.J., 2001; Пальцев М.А., 2004]. Указанное утверждение верно в большинстве случаев, однако, исследования ряда авторов выявили, что при некоторых условиях p38 ответственна за выживание клеток [Ringshausen I. et al., 2004; Suarez-Cuervo C. et al., 2004]. Установлено, что p38 MAPK в качестве молекулы выживания активируется в условиях повреждения клеточной ДНК. В литературе имеются данные, указывающие на то, что p38

МАРК вовлечена в обеспечение выживаемости опухолевых клеток независимо от повреждения ДНК и способствует метастазированию опухолей. Данный эффект опосредован p38 МАРК за счет регуляции секреции факторов, вовлеченных в выживаемость и миграцию клеток. Так, базальная активация p38 МАРК в В-клетках хронической лимфоцитарной лейкемии ответственна за экспрессию MMP-9 металлопротеиназы, которая необходима для выживания данных клеток при культивировании в присутствии стромальных клеток [Ringshausen I. et al., 2004]. Снижение базального уровня и TGF β 1-индуцированной MMP-9 активности было обнаружено в клетках рака молочной железы при генетическом и фармакологическом ингибировании p38 МАРК, что приводило к уменьшению метастазирования *in vivo* [Suarez-Cuervo C. et al., 2004].

В настоящее время известны 4 члена подсемейства p38 МАРК: p38- α (SAPK 2), p38- β (SAPK 2b), p38 γ (ERK 6/SAPK 3) и p38- δ (SAPK 4). Сравнение последовательности пептидов, составляющих киназы p38-МАРК семейства, с другими МАРК показало, что p38 изоформы имеют более 60% гомологичных аминокислотных остатков внутри группы и 40-45% - идентичных таковым с другими группами МАРК. Все четыре изоформы p38 МАРК могут быть активированы внеклеточными стимулами, к числу которых относят TNF- α , IL-1, ингибиторы синтеза белков и химические стрессовые стимулы (арсенит, перекись водорода и др.). Все члены семейства МАРК имеют одинаковые профили активации, различия между которыми в основном касаются кинетики и уровня активации [Strniskova M. et al, 2002].

Прямыми активаторами p38 МАРК являются вышерасположенные киназы сигнального каскада MEK 3, MEK 4 и MEK 6. MEK5 или TAK1 является киназой, передающей сигнал от MEK 3 и 6. Таким образом, p38 МАРК каскад представляет собой следующую цепь событий:



TAO/TAK/MEK5/4 могут быть активированы множеством внутриклеточных стимулов, включая составные компоненты физического и

химического стресса, такие как окислительный стресс, УФ-излучение, гипоксия, ишемия, а также ряд цитокинов. Было показано, что газы влияют на жизнедеятельность клеток с вовлечением семейства MAP киназ [Moog P.K. et al., 2003; Jeon H.K. et al., 2005; Wiegel B. et al., 2008]. Активация MAPK каскадов в ответ на воздействие оксида азота происходит практически во всех клетках, но следствия такой индукции могут варьировать в зависимости от типа клеток. Так, Erk 1/2 и p38 активируются при воздействии NO в клетках рака кишечника, но NO-индуцированный апоптоз опосредуется за счет p38, а не за счет Erk 1/2 активации [Jeon H.K. et al., 2005]. В эмбриональных стволовых клетках мышей ингибирование p38 MAPK предотвращало опосредованную оксидом азота транслокацию Вах к митохондриям [Lee J.H. et al., 2012]. Было показано, что H₂S активирует p38 MAP киназу, что может сопровождаться противоположно направленными эффектами. В экспериментах *in vitro* было показано, что сульфид водорода индуцирует пролиферацию эпителиальных клеток, апоптоз гладкомышечных клеток стенки аорты за счет активации Erk 1/2 [Moog P.K. et al., 2003]. Монооксид углерода оказывает антипролиферативный эффект на гладкомышечные клетки за счет активации p38 MAPK пути, а в Т-клетках - за счет ингибирования Erk MAPK активации [Wiegel B. et al., 2008].

В проведенном нами исследовании с использованием специфического ингибитора p38 MAPK SB203580 мы сконцентрировались на определении роли p38 митоген-активируемой киназы в проапоптотическом и антипролиферативном эффекте действия газовых трансмисмиттеров.

Изначально нами была определена концентрация ингибитора p38 MAPK, не имеющая собственного модулирующего эффекта на апоптоз клеток линии Jurkat. Для этого клетки указанной линии инкубировали с SB 203580 в дозах 2,65; 0,265 и 0,0265 мкМ в течение 30 мин.

Воздействие SB 203580 в дозе 2,65 мкМ на клетки линии Jurkat в течение 30 мин приводило к достоверному повышению количества апоптотически измененных клеток относительно интактной культуры

($p < 0,05$). Учитывая 7-ми кратную активацию апоптоза клеток при воздействии на них SB 203580 в дозе 2,65 мкМ, а также отсутствие данных литературы о самостоятельном антиапоптотическом действии p38 MAPK в физиологических условиях, нами был сделан вывод о том, что данная концентрация ингибитора является токсичной для клеток. Инкубация клеток с SB203580 в концентрации 0,265 и 0,0265 мкМ достоверных изменений оцениваемого параметра не вызывала ($p > 0,05$) (табл.17). Для дальнейшего изучения роли p38 MAPK в опосредованной газами регуляции апоптоза и пролиферации клеток нами была выбрана максимальная концентрация ингибитора p38 MAPK, не вызывавшая апоптоз, – 0,265 мкМ SB203580.

Таблица 17

Число апоптотически измененных клеток линии Jurkat после ингибирования p38 MAPK, Me(Q1-Q3)

Условия эксперимента	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками после 30 мин инкубации, %
Интактные клетки линии Jurkat	5,10(3,50-6,00)
Клетки после воздействия SB в дозе 2,65 мкМ	36,30(32,95-38,20) $p < 0,05$
Клетки после воздействия SB 203580 в дозе 0,265 мкМ	7,33(6,20-8,60) $p > 0,05$
Клетки после воздействия SB 203580 в дозе 0,0265 мкМ	7,20(6,50-8,40) $p > 0,05$

Далее мы определяли вовлеченность p38 MAPK в активацию апоптоза, вызванную изменением внутриклеточного содержания оксида азота. При этом оказалось, что инкубация клеток линии Jurkat со 100 мМ SNP с предварительно заингибированной p38 MAPK сопровождалась снижением количества клеток, вступивших в апоптоз, по сравнению с культурой клеток, обработанных только SNP ($p < 0,05$). Необходимо отметить, что число апоптотически-измененных клеток после ингибирования p38 MAPK-зависимых путей действия SNP достигало такового в интактной культуре

клеток линии Jurkat ($p > 0,05$). Следовательно, трансдукция апоптотического сигнала с участием SNF происходит исключительно за счет активации данной митоген-активируемой киназы. Аналогичная тенденция отмечалась при ингибировании p38 MAPK-зависимых путей действия 100 мкМ NOC-5 и 10 мМ NaHS (рис.16). Ингибирование p38 MAPK-зависимых путей проапоптотического действия монооксида углерода приводило к достоверному увеличению числа апоптотических клеток, по сравнению с культурой клеток, инкубированной только с CORM-2 ($p < 0,05$) (рис.18).

p38 MAPK в качестве молекулы выживания активируется в условиях повреждения клеточной ДНК. Известно, что ультрафиолетовое излучение, радиация и химиотерапевтические противоопухолевые агенты повреждают ДНК и приводят к гибели клеток [Tiwari M., 2012]. Эти же вещества являются индукторами p38 MAPK пути. Было показано, что активация p38 происходит в клетках линии Jurkat при их обработке УФ и 8-метоксипрозеленом. Однако ингибирование в этих клетках p38 с использованием специфического ингибитора увеличивало гибель клеток в дозозависимой манере [Cappellini A. et al., 2005]. Воздействие на В-клетки лимфомы этопозидом (химиотерапевтическим агентом, повреждающим ДНК) также активировало p38 MAPK, но генетическое и фармакологическое ингибирование данной молекулы усиливало проапоптотический эффект этопозиды [Kurosu T. et al., 2005]. Показано, что генетическое ингибирование p38 MAPK приводит к гибели нейронов мозжечка *in vitro* [Mao Z. and Wiedmann M., 1999]. Активация p38 MAPK за счет повышения экспрессии MKK6 защищала кардиомиоциты от апоптоза, индуцированного анизомицином (ингибитор белкового синтеза) [Zechner D. et al., 1998]. Было показано, что p38 MAPK обеспечивает выживаемость гранулоцитов (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) во время воспаления, а инактивация p38 необходима для реализации апоптоза и элиминации данных клеток при разрешении воспаления [Alvarado-Kristensson M. et al, 2002; Alvarado-Kristensson M. et al, 2004]. Молекулярным механизмом, опосредующим

указанный эффект, может являться ингибирующее фосфорилирование каспазы 3 и 8 нейтрофилов за счет p38 MAPK [Alvarado-Kristensson M. et al., 2004]. Однако p38 не может фосфорилировать данные молекулы непосредственно, поскольку идентифицированные в каспазах сайты фосфорилирования (SL) не соответствуют фосфорилирующим элементам MAP киназ. Возможно, монооксид углерода изменяет функционирование внутриклеточных сигнальных путей таким образом, что p38 MAPK опосредует антиапоптотические механизмы в условиях повышения внутриклеточной концентрации CO.

В настоящее время нет данных о том, что p38 может самостоятельно индуцировать пролиферацию и малигнизацию клеток, однако в ответ на повреждающее действие p38 MAPK способствует выживанию опухолевых клеток. Возможно, таким образом клетки блокируют цитотоксическое, направленное на нарушение целостности ДНК действие лекарственных веществ. Было показано, что, помимо повреждения ДНК, ионизирующая радиация вызывает активацию тирозин киназных рецепторов, например IGF-1R, ответственного за трансдукцию сигналов выживания. Активация p38 за счет IGF-1R вовлечена в радиорезистентность опухолей [Cosaceanu D. et al., 2007].

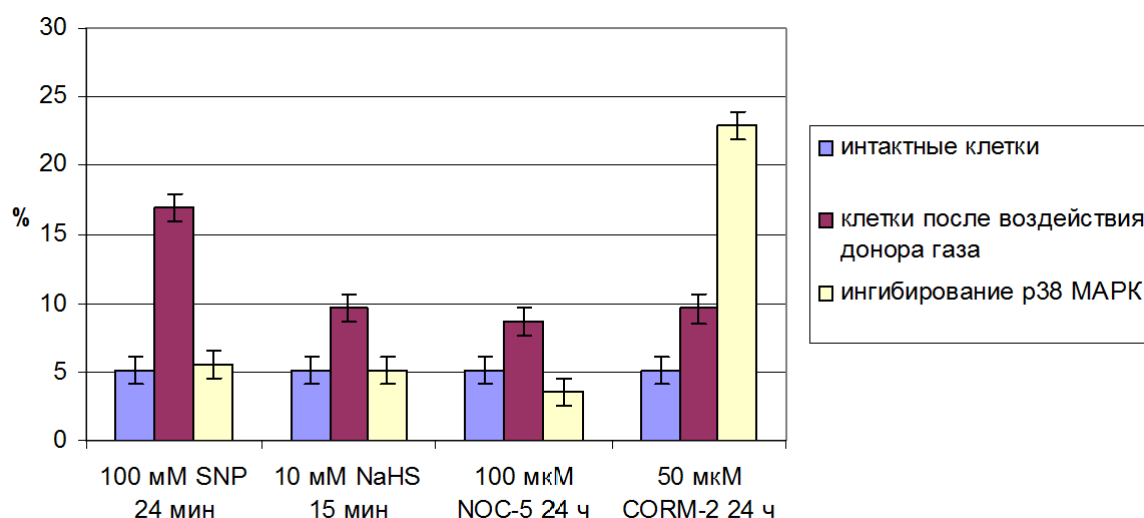


Рис.18 Процент апоптотически-измененных клеток после ингибирования p38 MAPK-зависимых путей действия доноров газов, (Me(Q₁-Q₃))

p38 MAPK вовлечена в индукцию G_2/M сверхочной точки клеточного цикла, и повышение выживаемости клеток в ответ на повреждение ДНК может быть объяснено увеличением времени репарации ДНК перед началом митоза, позволяющим опухолевым клеткам избежать впоследствии митотическую катастрофу [Hirose Y. et al., 2003].

Хорошо известно, что разрывы двойной спирали ДНК (DSBs) являются результатом действия на данную молекулу повреждающих агентов (ионизирующее излучение, химиотерапевтические лекарства) [Garvalov B. K., Asker T., 2011]. Однако DSBs могут иметь место в определенных типах клеток в отсутствие повреждающего сигнала. Экспрессия антигенспецифичного гена рецептора T(TCR) и B(BCR) клеток является уникальной и отличается от любого другого вида генетической экспрессии, поскольку требует перемещения множественных V, D и J сегментов ДНК для формирования кодируемого гена. Данный процесс носит название V(D)J рекомбинации и опосредован T- и B- специфичными эндонуклеазами RAG1 и RAG2. Последние способны распознавать последовательность рекомбинационного сигнала (RSSs). В процессе рекомбинации белки RAG связываются с последовательностями, сближают их и разрезают ДНК непосредственно перед RSSs с образованием «липких» концов ДНК. 3'гидроксильные группы данных концов атакуют другие нити ДНК с формированием двух независимых ДНК-шпилек (кодирующие участки). Двойные разрывы ДНК в вырезанных фрагментах (сигнальные концы) остаются разрывами. Таким образом, DSBs генерируются продолжительное время в развивающихся T- и B-клетках. Было показано, что p38 MAPK активирована на данной стадии развития T-клеток и ее активация зависит от наличия RAG-опосредованных DSBs [Hirose Y. et al., 2003]. In vivo активация p38 MAPK в данных клетках индуцирует G_2/M сверхочную точку клеточного цикла и способствует выживанию клеток [Pedraza-Alva G. et al, 2006].

Таблица 18

*Распределение клеток линии Jurkat по фазам клеточного цикла при ингибировании p38
МАРК-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, 24 ч	55,53 (55,35-55,78)	31,97 (31,57-32,19)	14,41 (13,76-15,72)
Клетки после действия 100 мкМ NOC-5, 24 ч	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 ингибирования p38 МАРК-зависимых путей действия 100 мкМ NOC-5, 24 ч	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 воздействия 50 мкМ CORM-2, 24 ч	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 ингибирования p38 МАРК-зависимых путей действия 50 мкМ CORM-2, 24 ч	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 50 мкМ NaHS, 24 ч	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 ингибирования p38 МАРК-зависимых путей действия 50 мкМ NaHS, 24 ч	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 действия 10 мМ NaHS, 24 ч	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 ингибирования p38 МАРК-зависимых путей действия 10 мМ NaHS, 24 ч	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: $p_1 < 0,05$ – по сравнению с интактными клетками линии Jurkat; $p_2 < 0,05$ – по сравнению с изолированным действием донора газа

p38 может также напрямую благоприятствовать процессам репарации ДНК, поскольку фармакологическое ингибирование p38 MAPK уменьшало связывание репарирующих Ku протеинов с ДНК [Cosaceanu D, et al., 2007]. Еще одним механизмом, за счет которого p38 MAPK может напрямую влиять на клеточную выживаемость, является регуляция активности β -катенина. Последний является транскрипционным фактором, влияющим на пролиферацию за счет регуляции экспрессии способствующих пролиферации генов, к числу которых относят c-myc. Уровень β -катенина зависит от мультипротеинового комплекса, содержащего опухолевый супрессор аденоматозного полипоза (APC), белка аксина и GSK3. Фосфорилирование β -катенина за счет GSK3 приводит к его убиквитинилизации и деградации. Сигналы, предотвращающие GSK3–опосредованное фосфорилирование β -катенина, приводят к аккумуляции последнего в цитозоле с последующей транслокацией в ядро [Alvarado-Kristensson M. et al, 2004].

В настоящем исследовании была проведена оценка роли p38 митоген-активируемой киназы в регуляции клеточного цикла клеток линии Jurkat при изменении внутриклеточной концентрации газовых транмиттеров. Установлено, что ингибирование p38-зависимых путей клеточной пролиферации не приводило к изменению числа клеток линии Jurkat в G_1 , S и G_2 фазах клеточного цикла, по сравнению с контролем ($p > 0,05$). 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 G_1 -, S- и G_2 -фазы клеточного цикла, по сравнению с культурами клеток, обработанными соответствующими донорами газов с действующей p38 MAPK ($p > 0,05$) (табл.18).

Таким образом, сигнал к активации апоптоза посредством оксида азота и сульфида водорода передается исключительно 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 газовых трансмиттеров. Наряду с этим, нами было установлено, что p38 MAPK не участвует в опосредованной газами регуляции клеточного цикла.

4.3 Влияние газотрансмиттеров на процессы реализации апоптоза опухолевых клеток

4.3.1 Молекулярные механизмы митохондриальной дисфункции при воздействии на клетки доноров газов

Известно, что смертыиндуцирующие 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. Липофильные катионы, аккумулируясь в митохондриальном матриксе, являются причиной появления разницы в потенциале между внутренней и наружной митохондриальными мембранами в соответствии с уравнением Нернста, постулирующим, что при 37°C гиперполяризация в 61,5 мВ ответственна за 10-ти кратное увеличение интрамитохондриальной концентрации моновалентных катионов. Поскольку при физиологических условиях митохондриальный трансмембранный потенциал составляет 120-180 мВ (внутримитохондриальная сторона является электронегативной), концентрация таких катионов в 2-3 раза выше в митохондриальном матриксе, чем в цитозоле. Благодаря наличию пор пермеабилзационного перехода (РТПС), происходит обмен метаболитами между цитозолем и матриксом митохондрий. При этом взаимодействие между гексокиназой (НК) и циклофилином D (сур D) с РТПС ингибирует пермеабилзацию наружной митохондриальной мембраны. Последнее событие возможно в результате включения следующих механизмов [Kroemer G. et al., 2007]:

- 1) проапоптотические сигналы могут напрямую вызывать дестабилизацию митохондриальных липидов, способствуя образованию пор, через которые выходят белки интрамембранного пространства;

2) длительное открытие РТРС, ассоциированное с потерей антиапоптотических взаимодействий с НК и сур D, может приводить к рассеиванию митохондриального трансмембранного потенциала с последующим осмотическим дисбалансом. Поскольку площадь внутренней митохондриальной мембраны значительно превышает таковую наружной, может происходить физический разрыв наружной мембраны митохондрий;

3) после активации проапоптотические члены семейства Bcl-2 могут транслоцироваться из цитозоля в наружную митохондриальную мембрану (Bax, Bid) или подвергаться конформационным изменениям (Bak). После перечисленных преобразований просуицидальные протеины могут связываться с компонентами РТРС. Полученные гетероолигомеры могут приводить к высвобождению протеинов, в норме локализованных в межмембранном пространстве митохондрий;

4) активированные проапоптотические протеины семейства Bcl-2 могут собираться в большие мультимеры, позволяющие выходить в цитозоль белкам межмембранного пространства.

Нами было показано, что воздействие донора оксида азота SNP в течение 15 мин приводило к многократному возрастанию числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом, по сравнению с аналогичным показателем в контроле ($p < 0,05$). 24-х часовая инкубация клеток с донором NO NOC-5 также приводила к резкому увеличению числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом относительно количества их в интактной культуре ($p < 0,05$). Процент клеток со сниженным $\Delta\psi$ после воздействия 10мМ донора сульфида водорода 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 ($p < 0,05$) (табл.19).

Известно, что митохондриальный трансмембранный потенциал представляет собой электрохимический градиент протонов, создаваемый цепью переноса электронов на внутренней мембране митохондрий. Рассеивание $\Delta\psi$ может происходить при потере целостности наружной и внутренней мембран митохондрий [Rustin P., Kroemer G., 2007]. Пермеабилзация митохондриальных мембран при действии доноров газов может быть следствием как прямого повреждающего действия данных веществ на липиды митохондриальных мембран, так и за счет изменения соотношения белков-регуляторов апоптоза семейства bcl-2.

Для определения характера действия газов (специфический либо неспецифический) в настоящем исследовании была предпринята попытка оценить вклад протеинов семейства Bcl-2 в зарегистрированное нами повышение проницаемости митохондриальных мембран.

Таблица 19

Число клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом после воздействия доноров газов, Me(Q1-Q3)

Условия эксперимента	Число клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом, %
Интактные клетки линии Jurkat	1,1(0,7-1,2)
Клетки после действия 100 мМ SNP, 15 мин	74,5 (67,1-79,2) $p_1 < 0,05$
Клетки после воздействия 10 мМ NaHS, 15 мин	8,4 (7,8-12,6) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$
Клетки после воздействия 100 мкМ NOC-5, 24 ч	80,7 (76,2-84,3) $p_1 < 0,05$, $p_2 > 0,05$, $p_3 < 0,05$
Клетки после воздействия 50 мкМ CORM-2, 24 ч	16,4 (15,9-18,5) $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$, $p_3 < 0,05$, $p_4 < 0,05$

Примечание:

$p < 0,05$ - по сравнению с интактной культурой клеток линии Jurkat; $p_2 < 0,05$ - по сравнению с клетками после воздействия SNP; $p_3 < 0,05$ - по сравнению с клетками после воздействия NaHS; $p_4 < 0,05$ - по сравнению с клетками после воздействия NOC-5.

Известно, что к антиапоптотическим членам данного семейства относится белок Bcl-2. Для объяснения антиапоптотической функции Bcl-2 было предложено несколько механизмов. P.N. Brenner et al. [2000] выдвинули гипотезу о канал-формирующей активности Bcl-2, который встраивается в мембрану и блокирует ион-проводящую активность транслокатора адениновых нуклеотидов (ANT). Другие теории рассматривают фосфорилирование/дефосфорилирование данного протеина, а также способность Bcl-2 гетеродимеризоваться с проапоптотическими членами семейства Bcl-2 и предотвращать их воздействие на митохондрии [Colitti M., 2012].

Было выявлено, что в интактной культуре клеток линии Jurkat содержание белка Bcl-2 составляло 2,17(1,87-2,48) усл.ед. 15-ти минутное воздействие доноров оксида азота и сульфида водорода приводило к резкому увеличению уровня Bcl-2 - до 17,65(12,72-21,50) и 11,26(10,25-13,46) усл.ед., соответственно ($p < 0,05$). Инкубация клеток с NOC-5 в течение 24 ч также сопровождалась повышением уровня указанного протеина, по сравнению с содержанием его в интактных клетках [3,67(3,35-3,73) и 2,17(1,87-2,48) усл.ед., соответственно] ($p < 0,05$). Монооксид углерода в концентрации 50 мкМ вызывал уменьшение содержания Bcl-2, по сравнению с контролем [1,13(0,80-1,47) и 2,17(1,87-2,48) усл.ед., соответственно] ($p < 0,05$). Донор CO CORM-2 также приводил к снижению содержания другого антиапоптотического белка Bcl-X_L до 1,23(0,86-1,59) усл.ед., по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре клеток линии Jurkat [10,21(7,72-12,70) усл.ед., ($p < 0,05$)]. Bcl-X_L способен ингибировать апоптоз за счет образования неактивного тройного комплекса Bcl-X_L, Araf-1 и каспаза-9, вместо апоптосомы (комплекс цитохром с, Araf-1 и каспаза-9) [Bertini I. et al., 2011]. Уровень протеина Bcl-X_L при воздействии SNP составил 12,35(10,34-14,60) усл.ед., при воздействии NaHS – 14,29(12,86-16,34) усл.ед.; 10,98(9,86-11,71) усл.ед. при воздействии NOC-5; вышеуказанные

значения не отличались достоверно от соответствующего параметра в контроле 10,21(7,72-12,70) ($p>0,05$) (рис. 19-22).

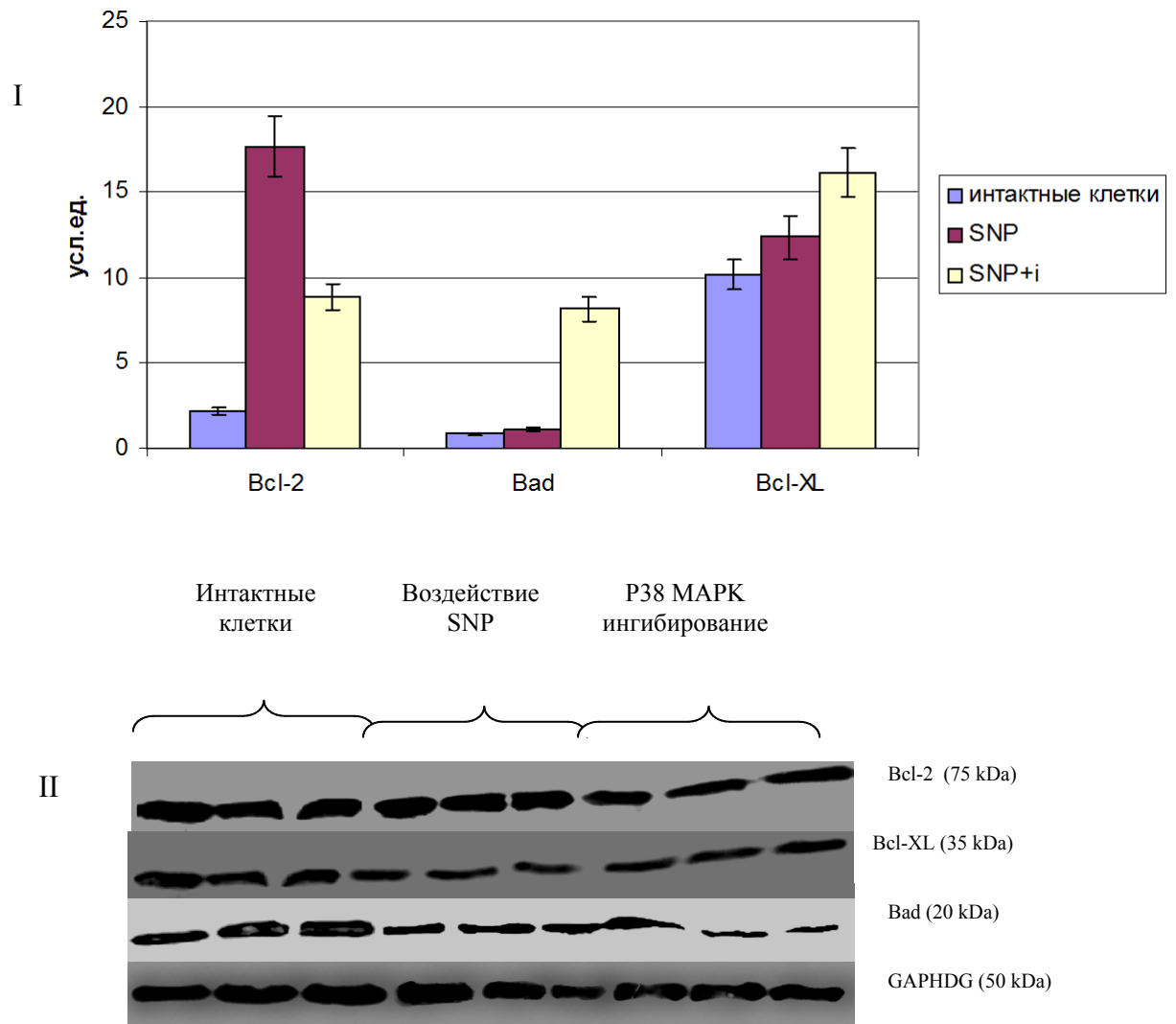


Рис.19 Содержание белков семейства Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия донора оксида азота, SNP:

I – уровень белков семейства Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия SNP, (Me(Q₁-Q₃));

II – результаты вестерн блот анализа белков семейства Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия SNP

Если антиапоптотические белки семейства Bcl-2 препятствуют повышению проницаемости митохондриальных мембран, проапоптотические члены данного семейства прямо или опосредованно способствуют их пермеабилзации. Белок Bad относится к подклассу проапоптотических только-ВНЗ протеинов и способен с высокой аффинностью связываться с определенными антиапоптотическими молекулами и запускать

программированную гибель [Harro L. et al., 2012]. Необходимым условием для такой активности является ВНЗ-домен [Hartman M.L., Czyz M., 2012]. Он адаптирует амфипатическую α -спиральную конформацию для встраивания в гидрофобную петлю антиапоптотических протеинов, нейтрализуя их активность для усиления апоптоза [Elkholi R. et al., 2011; Shamas-Din A. et al., 2011].

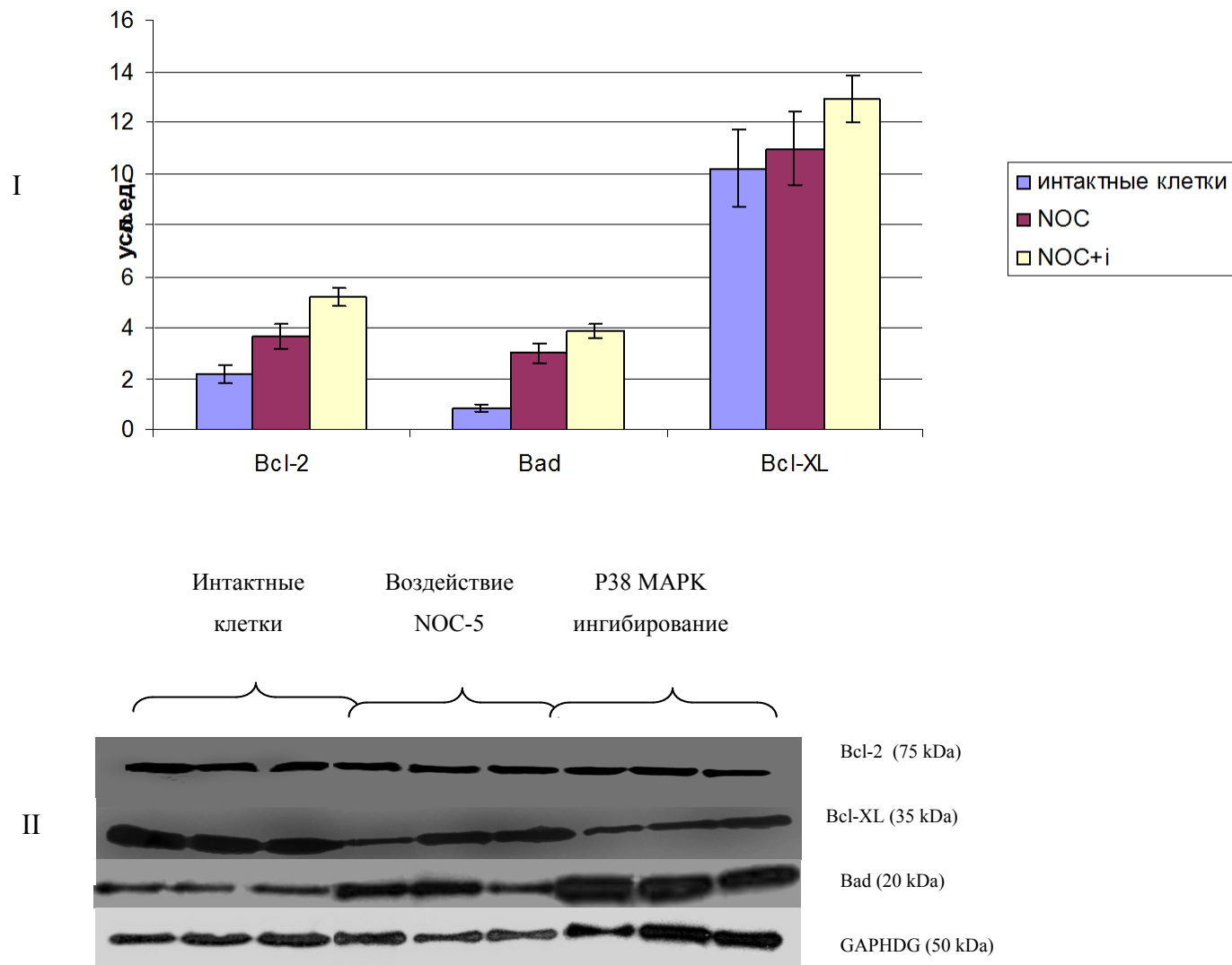


Рис.20 Содержание белков семейства Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия донора оксида азота NOC-5:

I – уровень белков семейства Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия NOC-5, (Me(Q₁-Q₃));

II – результаты вестерн блот анализа белков семейства Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия NOC-5

ВНЗ домены обладают четырьмя консервативными гидрофобными остатками, расположенными с интервалами на одной стороне

амфипатической петли. Каждый из данных остатков встраивается в определенный карман в гидрофобной петле антиапоптотического протеина. Мутационные изменения аминокислотной последовательности описанных участков редуцируют аффинность только-BH3 протеинов к их мишеням, уменьшая проапоптотическую активность [Leibowitz B., Yu J., 2010; Elkholi R. et al., 2011; Shamas-Din A. et al., 2011].

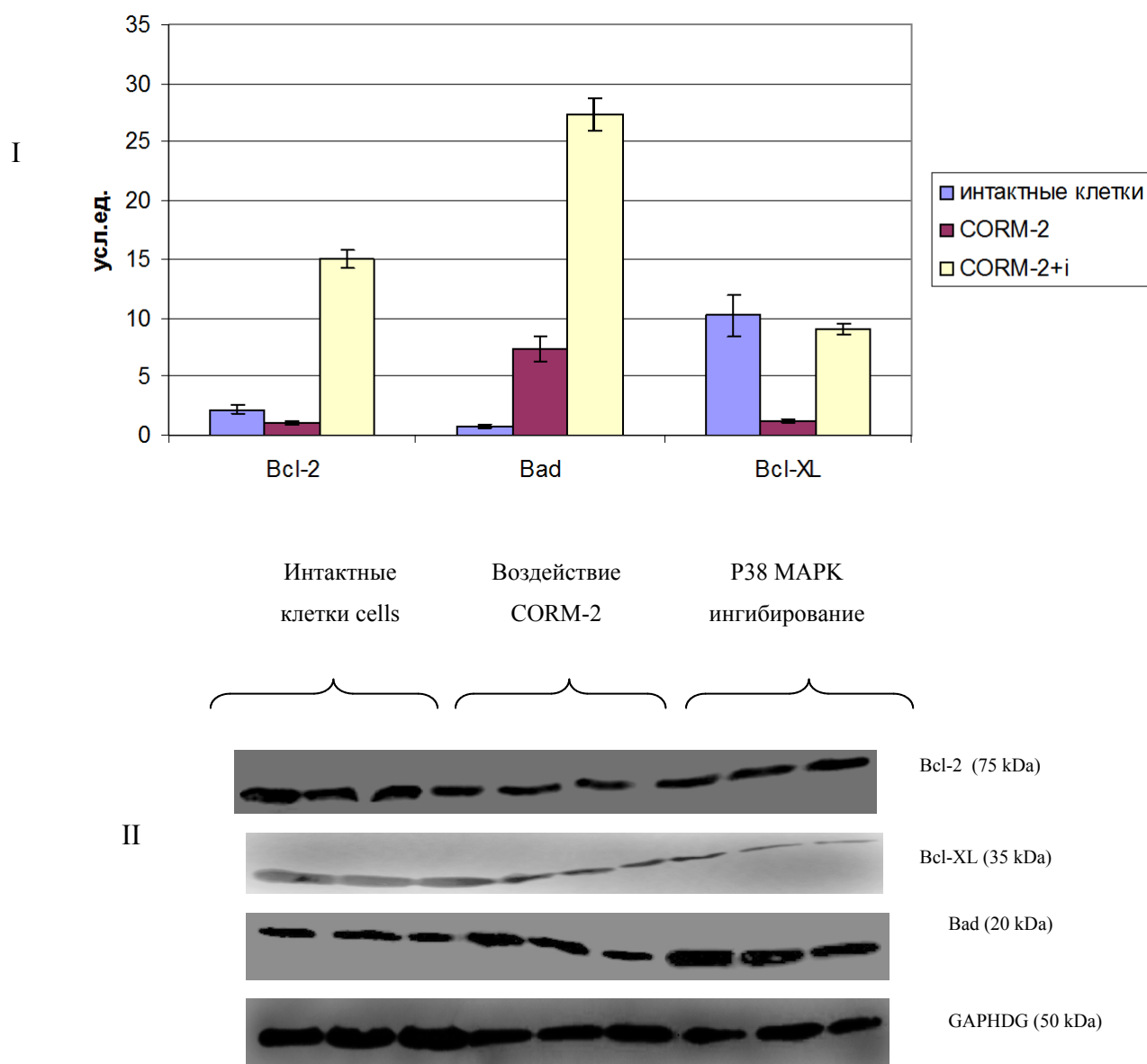


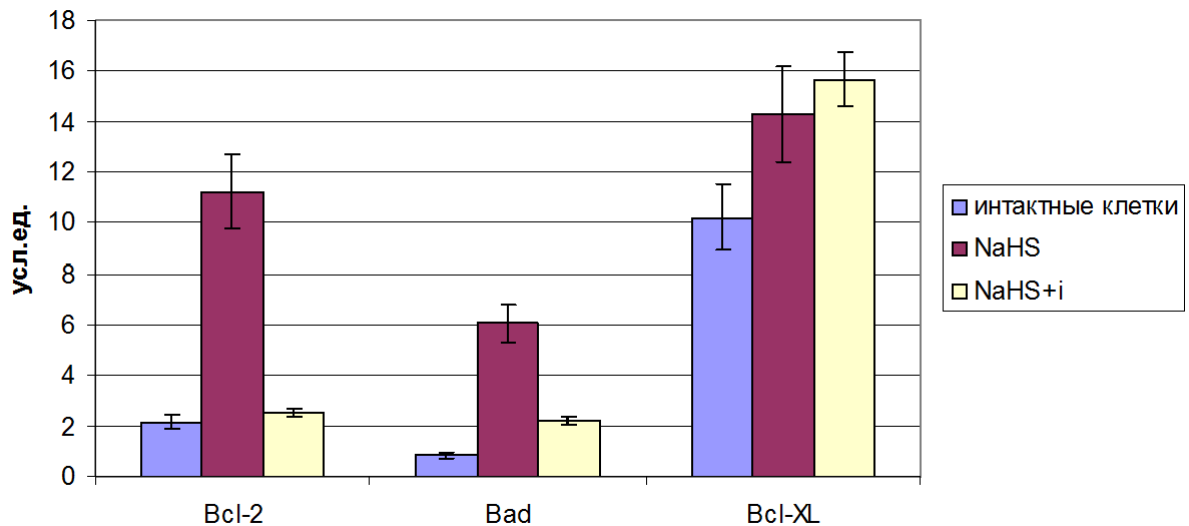
Рис.21 Содержание белков семейства Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия донора монооксида углерода CORM-2:

I – уровень белков семейства Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия CORM-2, (Me(Q₁-Q₃));

II – результаты вестерн блот анализа белков семейства Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия CORM-2

Как показали результаты настоящего исследования, содержание проапоптотического белка Bad в интактных клетках линии Jurkat составило 0,83(0,66-0,92) усл.ед. Воздействие 100 мМ SNP в течение 15 мин не приводило к изменениям содержания указанного протеина относительно аналогичного параметра в контроле [1,14(0,47-1,71) усл.ед.] ($p>0,05$).

I



II

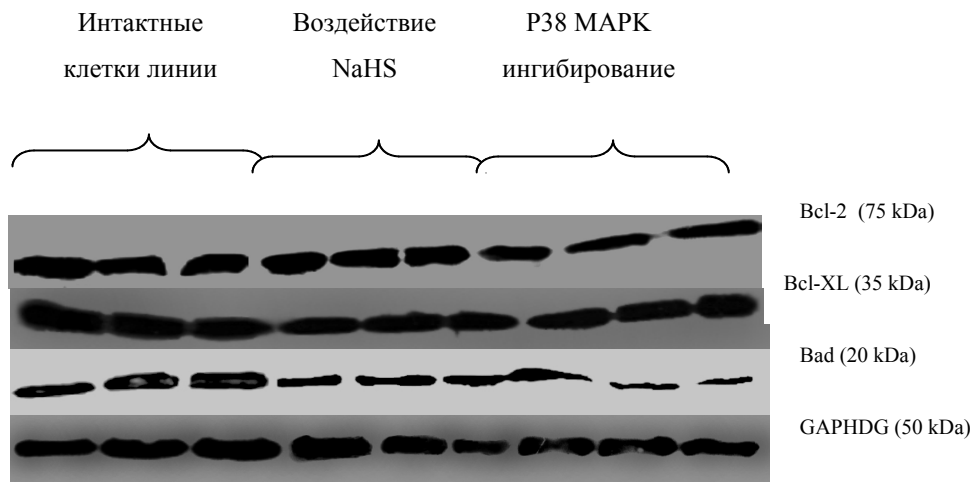


Рис. 23 Содержание белков семейства Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия донора сульфида водорода:

I – уровень белков семейства Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия NaHS, (Me(Q₁-Q₃));

II – результаты вестерн блот анализа белков семейства Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия NaHS.

Содержание белка Bad возрастало до 3,00(2,91-3,33) усл.ед. при инкубации клеток с NOC-5, до 7,33(5,99-8,47) усл.ед. - при инкубации клеток

с CORM-2 и до 6,04(5,62-6,11) усл.ед. - при воздействии на клетки NaHS, по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,05$) (рис. 19-22).

Таким образом, доноры газовых трансммиттеров оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода обладают способностью изменять соотношение белков семейства Bcl-2 в клетках линии Jurkat *in vitro*. Возможно, дисбаланс в системе указанных протеинов играет ключевую роль в увеличении количества клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом при воздействии на клетки доноров газов. Однако в случае непродолжительной инкубации клеток с SNP и NaHS в течение 15 мин причиной пермеабилзации митохондриальных мембран может являться прямое повреждающее влияние газов. Так, нами было показано, что в случае инкубации клеток со 100 мМ SNP происходило многократное снижение митохондриального трансмембранного потенциала на фоне резкого увеличения уровня антиапоптотического белка Bcl-2.

Известно, что митохондрии содержат большое количество гемсодержащих, а также железо- и серосодержащих белков, с которыми NO (или ONOO-) активно соединяется [Реутов В.П., 2002]. Воздействие высоких концентраций оксида азота приводит к разобщению окислительного фосфорилирования на уровне цитохромоксидазы, увеличению количества супероксид аниона и к синтезу пероксинитрита при взаимодействии NO с супероксидом. Пероксинитрит ингибирует практически все компоненты электронной транспортной цепи, включая комплекс I (NADH дегидрогеназу), комплекс II (сукцинат дегидрогеназу), комплекс III (цитохром с редуктазу) и комплекс V (АТФ синтазу), путем окисления цистеина, нитрозилирования тирозина и повреждения Fe-S центров белков [Pacher P. et al., 2007]. Показано также, что пероксинитрит приводит к открытию пор пермеабилизационного перехода митохондриальных мембран, состоящих из транслокатора адениловых нуклеотидов (ANT), циклофилина D (CyC-D) и вольтажзависимого анионного канала (VDAC). Пероксинитрит вызывает окисление тиолов в ANT [Vieira et.al., 2001].

Нами было продемонстрировано, что инкубация клеток со 100 мМ SNP в течение 15 мин приводила к увеличению уровня внутриклеточной продукции АФК. Данный факт подтверждает предположение о том, что пермеабиллизация митохондриальных мембран и снижение $\Delta\psi$ при действии нитропрусида натрия являются следствием прямого повреждающего (окислительного) действия данного вещества на белки и липиды мембран митохондрий. Повышение содержания Bcl-2 может являться защитно-приспособительной реакцией клеток, направленной на сохранение целостности митохондриальных мембран. В случае воздействия на клетки 10 мМ NaHS также было выявлено возрастание числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом. При этом, несмотря на мощные восстановительные способности сульфида водорода, нами было зафиксировано возрастание уровня АФК в клетках после воздействия на них донора данного газа. Известно, что сульфид водорода обладает способностью изменять функционирование гемсодержащих белков. Так, гемоглобин, миоглобин, каталаза, а также лактопероксидаза содержат остатки гистидина в непосредственной близости к гему, что может играть ключевую роль в формировании сульфгема. В цитохром-с-оксидазе остатки гистидина не имеют необходимую ориентацию для непосредственного образования сульфгема. При этом сульфид водорода восстанавливает железо гема в составе цитохром-с-оксидазы. В цитохроме с гем координирован метионином и гистидином в дистальных и проксимальных сайтах, соответственно. Механизм, за счет которого сульфид водорода восстанавливает гемовый центр цитохрома с, также неизвестен, возможно, сульфид связывается и восстанавливает железо гема, тем самым изменяя окислительно-восстановительный статус белка в целом.

Полученные нами результаты позволяют предполагать, что сульфид водорода, связываясь с митохондриальными гем-содержащими белками, вызывает разобщение окислительного фосфорилирования с последующей генерацией АФК и пермеабиллизацией митохондриальных мембран. Следует

отметить, что при инкубации клеток линии Jurkat с донором сульфида водорода происходит возрастание уровня как антиапоптотического белка Bcl-2, так и проапоптотического протеина Bad. Последний, связываясь с Bcl-2, может нейтрализовать его защитную функцию.

Воздействие донора монооксида углерода сопровождается коллапсом митохондриального трансмембранного потенциала в 16,4(15,9-18,5)% клеток. При этом было выявлено уменьшение содержания антиапоптотических протеинов Bcl-2 и Bcl-X_L на фоне увеличения содержания проапоптотического белка Bad. Последний способен оказывать промотирующее влияние на проапоптотические пороформирующие белки Bax и Bak, способствуя пермеабиллизации митохондриальных мембран. Кроме того, известно, что формирование мультиолигомерных комплексов Bax и Bak полностью и специфически ингибируется Bcl-X_L [Kroemer G., 2007]. Снижение содержания данного протеина при инкубации клеток с CORM-2 может являться одной из причин повышения проницаемости мембран митохондрий. Следовательно, дисбаланс семейства Bcl-2 является основной причиной повышения числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом при действии CO.

В проведенном нами исследовании 24-х часовая инкубация клеток линии Jurkat с донором оксида азота NOC-5 приводила к возрастанию содержания проапоптотического белка Bad и антиапоптотического протеина Bcl-2. При этом отмечалось многократное повышение числа клеток со сниженным значением митохондриального трансмембранного потенциала. Полученные данные позволяют предполагать, что белкам семейства Bcl-2 принадлежит лишь вспомогательная роль в регуляции митохондриальной проницаемости при действии на клетки оксида азота. Необходимо отметить, что уровень АФК продукции и содержание белка p53 при инкубации клеток с NOC-5 сопоставимы с таковыми при обработке клеток CORM-2. При этом количество клеток со сниженным $\Delta\psi$ в случае действия донора оксида азота многократно превышало таковое в случае воздействия на клетки донора

монооксида углерода. Данный факт позволяет предполагать, что АФК не принадлежит ключевая роль в регуляции целостности митохондриальных мембран при действии оксида азота. Возможно, пермеабилзация митохондрий происходит в результате реакций нитрозилирования митохондриальных белковых комплексов [Janssen-Heininger Y.M. et al., 2008]. Данное предположение подтверждает отсутствие различий в числе клеток со сниженным $\Delta\psi$ после воздействия различных доноров NO.

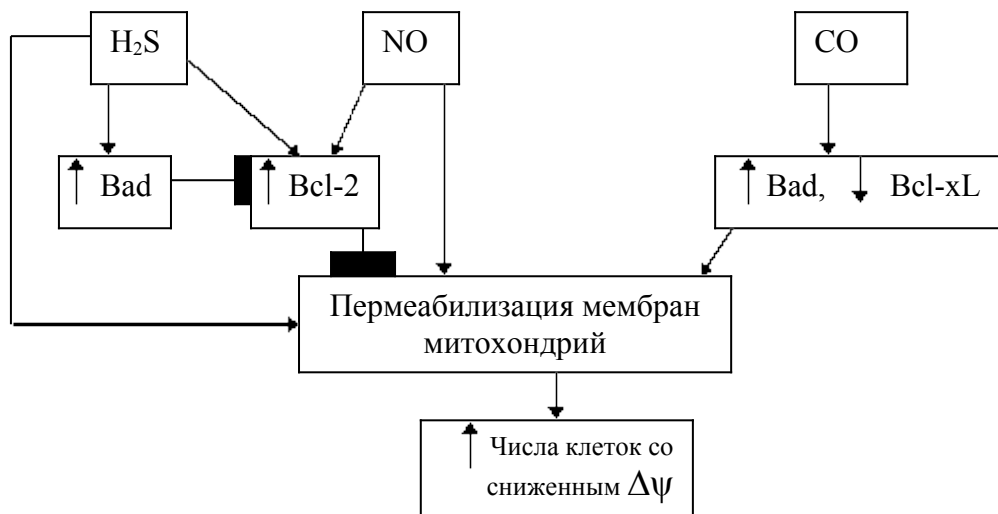


Рис. 23 Влияние доноров внутриклеточных газовых транмиттеров (оксида азота, монооксида углерода, сульфида водорода) на соотношение белков семейства Bcl-2 и проницаемость митохондриальных мембран в клетках линии Jurkat

Таким образом, повышение проницаемости митохондриальных мембран при действии на клетки линии Jurkat 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 различных концентраций

доноров оксида азота может быть обусловлен нитрозилированием митохондриальных белковых комплексов (рис.23).

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

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. Субстраты каспаз, такие как PARP, DNA-PK и U1-70kD, вовлечены в репарацию клеточной ДНК. Инактивация данных молекул за счет их расщепления каспазами приводит к деградации ДНК [Launay S. et al., 2005].

Активируемая каспазами дезоксирибонуклеаза (CAD) является конститутивной магний-зависимой эндонуклеазой, играющей важную роль в деградации ДНК при реализации апоптоза в клетках млекопитающих. В норме CAD содержится в ядре в комплексе со специфическим ингибитором ICAD. Последний является не только ингибитором CAD, но и молекулярным шапероном, необходимым для правильной самосборки данной дезоксирибонуклеазы. При апоптозе каспаза-9 повреждает ядерные поры (механизм данного явления в настоящее время неизвестен), что позволяет каспазе-3 проникать в ядро и отщеплять ICAD. Таким образом, CAD высвобождается из комплекса и участвует в деградации ДНК [Yuan C.Q., Ding Z.H., 2002]. Ламин А и фодрин необходимы для формирования ядерной оболочки и цитоскелета, соответственно. Расщепление ламина каспазами при реализации апоптоза приводит к конденсации хроматина и декомпозиции ядерной мембраны. Разрушение фодрина каспазами сопровождается образованием апоптотических телец. Когда все субстраты каспаз активируются, с клеткой происходит ряд изменений, включающих нарушение экспрессии генов, снижение возможности репарации

повреждений ДНК, активацию зимогенов или инактивацию ферментов, разрушение цитоскелета и фрагментацию хроматина; при этом клетка необратимо подвергается апоптозу (рис.24) [Lü C.X. et al., 2003; Wang Z.B. et al., 2005].

Каспаза-3 является ключевым исполнителем апоптотической программы и представляет собой активную форму прокаспазы-3. Последняя может быть активирована каспазами-3, -8, -9, -10, CPP32 активирующей протеазой, гранзимом В (GranB) и другими молекулами. Мишенями индуцированной каспазы-3 являются прокаспаза-3, -6 и -9, ДНК-РК, РКСγ, PARP, D4-GDI (D4 GDP-диссоциированный ингибитор), белок, связанный со стероидным ответом, U₁-70kD, ингибитор активированной каспазами деоксирибонуклеазы (ICAD) и др. [Cowling V., Downward J., 2002; Sattar R. et al., 2003] (рис.16).

В проведенном нами исследовании активность каспазы 3 в интактных клетках линии Jurkat была принята за единицу. Воздействие доноров газов приводило к достоверному повышению активности каспазы 3 до 2,17(2,04-2,19) усл.ед. в случае 15 мин воздействия нитропруссид натрия; до 1,64(1,59-1,68) усл.ед. - при воздействии NaHS; до 1,62(1,57-1,66) усл.ед. – в случае 24 ч воздействия NOC-5 и до 1,46(1,20-1,31) усл.ед. - в случае инкубации клеток с CORM-2, по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (табл.20).

Результаты оценки активности каспазы-3 свидетельствуют об эффективной индукции данного фермента в условиях изменения внутриклеточной концентрации газовых трасммиттеров. Каспаза 3 является эффекторным энзимом апоптотической программы, тогда как роль инициаторных ферментов, активирующих каспазу 3, принадлежит каспазам 8 и 9. Каспаза 8 активируется при запуске рецепторного пути инициации апоптоза, каспаза 9 – митохондриального. Существуют данные, свидетельствующие о том, что газы могут влиять на рецепторный путь реализации апоптоза. Так, оксид азота увеличивает экспрессию Fas рецептора в клетках рака яичника, сульфид водорода повышает продукцию TNF-α, IL-

1 β и IL-6 в моноцитарной клеточной линии [Zhi L. et al., 2007]. Монооксид углерода ингибирует липополисахарид-активированный синтез цитокинов [Liu D-m. et al., 2008].

Таблица 20

Активность каспаз 3 и 9 в культуре клеток линии Jurkat после действия доноров газов, Me(Q1-Q3)

Условия эксперимента	Активность каспазы 3, усл.ед.	Активность каспазы 9, усл.ед.
Интактные клетки	1(0,99-1,01)	1(0,99-1,01)
Клетки после действия 100 мМ SNP	2,17 (2,04-2,19) p<0,05	3,09 (3,06-3,11) p<0,05
Клетки после действия 10 мМ NaHS	1,64 (1,59-1,68) p<0,05	2,71 (2,69-2,74) p<0,05
Клетки после действия 100 мкМ NOC-5	1,62 (1,57-1,66) p<0,05	0,96 (0,91-1,01) p>0,05
Клетки после действия 50 мкМ CORM-2	1,46 (1,20-1,31) p<0,05	1,67 (1,61-1,70) p<0,05

Нами была предпринята попытка оценить вклад TNF-опосредованного рецепторного пути апоптоза в индукцию каспазы 3 в условиях изменения внутриклеточной концентрации газовых трансммиттеров. Рецепторы способны воспринимать внеклеточные сигналы к апоптозу, передавая их внутрь клетки с помощью внутриклеточных адаптерных молекул, преобразующих сигнал к апоптозу. Классическими специфическими рецепторами, индуцирующими апоптоз, являются суперсемейство TNF-рецепторов. Среди них выделяют Fas (C95, APO-1), TNF-R1, DR3/WS1-1, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2 и DR6, содержащие в цитоплазматическом участке «домен смерти», обеспечивающий активацию каскада каспаз [Silke J., 2011].

Численность TNFR1-экспрессирующих клеток линии Jurkat после инкубации со 100 мМ SNP была выше таковой в интактной культуре клеток линии Jurkat (p<0,05). Инкубирование интактных клеток линии Jurkat со 100 мкМ NOC-5 не вызывало достоверных изменений количества экспрессированных на поверхности клетки TNFR1, по сравнению с

соответствующими значениями в контроле ($p > 0,05$). Сульфид водорода на экспрессию клетками линии Jurkat рецепторов к $\text{TNF}\alpha$ также не влиял ($p > 0,05$). Воздействие монооксида углерода приводило к 40-кратному повышению значений изучаемого параметра, по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (табл.21). Показано, что монооксид углерода, подобно оксиду азота, влияет на жизнедеятельность клеток за счет связывания с железом гем-содержащих транскрипционных факторов. Однако способность данного вещества взаимодействовать с гемом значительно ниже, чем у NO [Mustafa A.K. et al., 2009]. В настоящее время идентифицирован только один транскрипционный фактор, являющийся специфической мишенью действия CO, - нейрональный транскрипционный фактор NPAS2, ответственный за регуляцию циркадных ритмов [Dioum E.M. et al., 2002].

Полученные нами данные, доказывающие способность CO повышать экспрессию TNFR1 клетками линии Jurkat, позволяют предполагать наличие специфических мишеней данного газового траснмиттера в системе регуляции апоптоза.

Также известно, что оксид азота вступает в реакцию нитрозилирования с сульфгидрильными группами цистеина, что в большинстве случаев приводит к ингибированию активности белков-мишеней [Sen N., Snyder S.H., 2010]. Возможным представляется сценарий, в ходе которого оксид азота, реагируя с гемом транскрипционных факторов, ответственных за экспрессию TNFR1, повышает их активность, что было продемонстрировано нами при непродолжительной 15-ти минутной инкубации клеток с донором оксида азота. Однако последующее нитрозилирование в случае более продолжительного по времени присутствия оксида азота в клетках ингибирует наработку рецептора. Подобное ингибирование не может происходить в случае воздействия на клетки монооксида углерода.

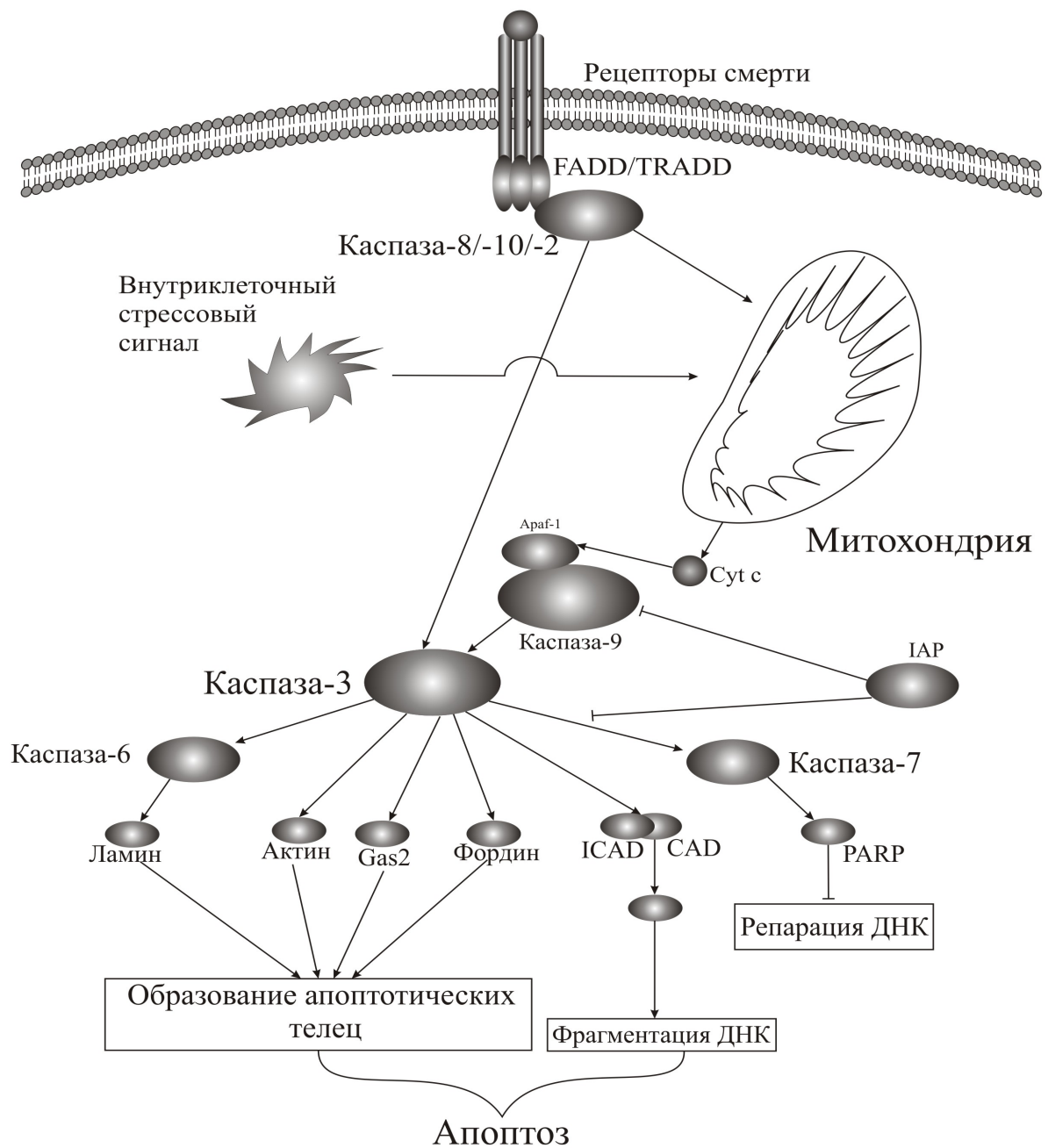


Рис.24 Пути активации каспазы 3 и ее внутриклеточные мишени [по данным С.Х. Lü et al., 2003; Z.B. Wang et al., 2005]

Наличие на клеточной мембране рецепторов не позволяет судить о том, инициируется ли апоптоз по рецепторному пути или нет. Для ответа на этот вопрос было целесообразно зафиксировать присутствие соответствующего лиганда $\text{TNF}\alpha$, 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 воздействия газов показал, что величина этого показателя *in vitro* снижалась при воздействии донора оксида азота SNP и сульфида водорода NaHS, по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Воздействие донора оксида азота NOC-5 и монооксида углерода CORM-2 на продукцию TNF- α влияния не оказывало ($p > 0,05$) (табл.21).

Таблица 21

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

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

Известно, что транскрипция гена TNF α регулируется транскрипционными факторами NF- κ B и ядерным фактором, активирующим Т-клетки (NF-AT). Продукция TNF α также регулируется на уровне трансляции за счет богатых - UA последовательностей в 3'-нетранслируемом регионе мРНК TNF α [Parameswaran N., Patial S., 2010]. Молекулярные механизмы действия сульфида водорода опосредованы реакциями сульфгидрирования (по аналогии с нитрозилированием для NO) [Sen N., Snyder S.H., 2010]. Возможно, сульфгидрирование молекулярных мишеней, ответственных за синтез TNF α , приводит к ингибированию продукции данного цитокина.

Таким образом, ни один из используемых нами доноров газовых трансмиттеров не приводил к одновременному увеличению экспрессии TNFR1 и синтезу соответствующего лиганда клетками Т-лимфобластной лейкемии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что рецепторный TNF-опосредованный вариант не может являться причиной активации инициаторной каспазы 8 с последующим энзиматическим расщеплением каспазы 3 и запуском апоптоза при действии газов.

Нарушение целостности митохондриальных мембран приводит к выходу в цитозоль различных проапоптотических факторов [Kroemer D., 2007]. Последние вызывают активацию основных эффекторных молекул апоптоза – каспаз. Так, соединение цитозольной неактивной прокаспазы-9, АТФ, Араф-1 и цитохрома с приводит к образованию массивного комплекса - апоптосомы. Нами было продемонстрировано, что воздействие 100 мМ SNP, 10 мМ NaHS и 50 мкМ CORM-2 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 ($p > 0,05$) (табл. 19). Необходимо также отметить, что при 15 мин воздействии SNP происходило 70-ти кратное увеличение числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом, тогда как при воздействии донора СО данный параметр увеличивался в 16 раз, а в случае NaHS - в 8 раз, по сравнению с контролем. При этом нами не было отмечено соответствующей тенденции к возрастанию активности инициаторной каспазы 9 в ряду NO-CO-H₂S, несмотря на столь существенные различия в уровне проницаемости митохондриальных мембран при действии указанных газов. 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). Нами была предпринята попытка оценить вклад белков-ингибиторов каспаз xIAP и Aven в молекулярные механизмы

регуляции активности каспаз при действии всех трех 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 донора монооксида углерода, 10 mM NaHS и 100 mM SNP показала, что уровень Aven при указанных условиях не изменялся относительно контроля ($p > 0,05$). Нами было показано, что при действии микромолярной концентрации NO в клетках возрастает содержание белка Aven относительно уровня его в интактной культуре клеток линии Jurkat ($p < 0,05$) (рис.25). Возможно, данный протеин нивелирует выход проапоптотических факторов из митохондрий на уровне ингибирования активности каспазы-9 при инкубации клеток NOC-5 в концентрации 100 мкМ.

Нами также была предпринята попытка оценить 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]. Установлено, что для связывания xIAP с эффекторными каспазами 3 и 7 необходимо наличие BIR2-домена в структуре данного белка. BIR-2 домен ингибирует активность каспазы 3 путем отщепления каспазы от ее субстратов [Tenev T. et al., 2005]. При Fas-индуцированном апоптозе xIAP не связывает каспазу 8, а подавляет активность каспазы-3 [Tsuchiya Y. et al., 2005]. Показано, что xIAP участвует в связывании каспаз при реализации митохондриального пути апоптоза. Для ингибирования инициаторной каспазы 9 требуется наличие в белке xIAP домена BIR3. Посредством связывания гетеродимера BIR-3 домена с

мономерной формой каспазы 9 не происходит димеризации и активации каспазы 9 [Shiozaki E.N. et al., 2003]. Также xIAP 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 составило 14,64(13,63-16,09) усл.ед. после инкубации клеток Т-лимфобластной лейкемии с донором сульфида водорода, что достоверно не отличалось от аналогичного параметра в контроле - 15,57(14,29-16,84) усл.ед. ($p>0,05$). Уровень xIAP снижался до 9,25(5,53-12,98) усл.ед. после действия донора СО на клетки линии Jurkat по сравнению с таковым в контроле ($p<0,05$). Воздействие обоих используемых доноров оксида азота (100 мМ SNP и 100 мкМ NOC-5) приводило к повышению уровня xIAP до 21,47(20,31-28,44) и 21,68(20,63-22,05) усл.ед., соответственно ($p<0,05$) (рис.25). Известно, что в результате воздействия оксида азота в клетках происходит нитрозилирование каспаз, что приводит к ингибированию активности данных ферментов и торможению 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 показано, что инактивация каспазы 9 при действии на клетки оксида азота также может происходить под влиянием белков-ингибиторов каспаз, уровень которых при действии NO повышается.

Таким образом, было установлено, что активация каспазы-3 при действии NO, СО и H₂S происходит за счет активации митохондриального пути апоптоза. При этом действие всех трех газов не приводит к эффективной индукции рецепторного пути. Так, действие монооксида углерода *in vitro* увеличивает экспрессию TNFR1 на поверхности клеток; при этом синтеза соответствующего цитокина не происходит, что сохраняет готовность Jurkat клеток вступить на рецепторный путь апоптоза при изолированном действии СО нереализованной. Однако в условиях

воспалительного процесса в организме данное свойство может вносить свой вклад в провоспалительное и проапоптотическое действие монооксида углерода. Снижение синтеза TNF- α под действием H₂S обосновывает целесообразность поиска противовоспалительных агентов, высвобождающих сульфид водорода.

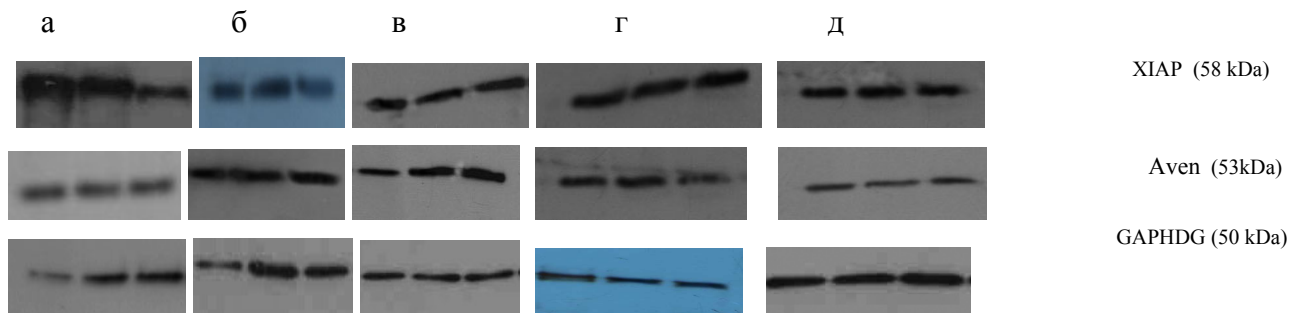


Рис.25 Содержание белков-ингибиторов каспаз XIAP и Aven в клетках линии Jurkat после воздействия доноров газов: а – intactные клетки линии Jurkat; б – клетки линии Jurkat после воздействия SNP; в – клетки линии Jurkat после воздействия NOC-5; г – клетки линии Jurkat после воздействия CORM-2; д – клетки линии Jurkat после воздействия 10 mM NaHS.

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. При этом, если повышение проницаемости митохондриальных мембран при действии оксида азота опосредовано возросшим уровнем АФК продукции и окислительными свойствами самого оксида азота, то ингибирование каспазы 9 за счет белков xIAP и Aven является ярким доказательством присутствия специфических механизмов действия NO в регуляции программированной гибели клеток (рис.26).

4.3 Нарушения регуляции продолжительности G₁-фазе клеточного цикла клеток линии Jurkat при воздействии 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].

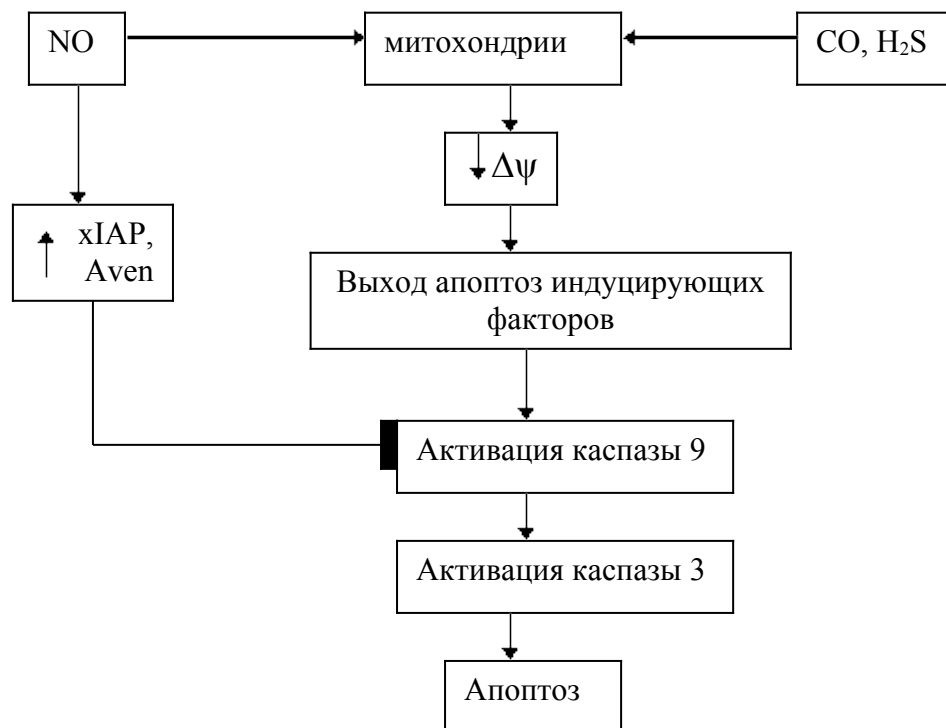


Рис.26 Молекулярные механизмы активации каспаз при действии на клетки линии Jurkat газовых трансмисмиттеров

В проведенном нами исследовании было установлено, что содержание циклин-зависимой киназы 4 в интактных клетках линии Jurkat составляет 8,06(7,65-8,38) усл.ед. Известно, что уровень данного фермента в клетках высоко консервативен и не регулируется на уровне экспрессии [Lavecchia A., Giovanni C.D., 2012]. Действительно, воздействие доноров всех трех изучаемых газов не влияло на содержание Cdk4 в клетках линии Jurkat ($p > 0,05$) (табл.22).

Регуляторными единицами циклин-зависимых киназ G₁-фазы Cdk4/Cdk6 и Cdk2 являются циклины D-типа (D1, D2 D3) и циклин E, соответственно. ЦиклинD/Cdk4-Cdk6 активируются в середине G₁-фазы и предшествуют активации Cdk2/циклин E. Изучение транскрипционного контроля экспрессии циклинов привело к созданию модели, согласно которой, прогрессия G₁-фазы клеточного цикла происходит под влиянием циклинов G₁-фазы, которые поддерживают свой синтез на определенном уровне и промотируют прогрессию S-фазы и митотических циклинов, при этом последние репрессируют циклины G₁-фазы [Coqueret O., 2002].

Субъединицы циклинов являются необходимыми адапторами циклин-зависимых киназ, активируя их и соединяя с субстратами. Эволюционно все циклины имеют одного предшественника, однако, циклины G₁-фазы значительно отличаются от прочих белков данной группы, что определяет уникальную субстратную специфичность данных циклинов. Понимание каким образом происходит распознавание субстрата пришло при изучении кристаллической структуры связывания циклина A с Cdk2 и ингибитором p27 или фрагментом его субстрата p107 [Brown N. R. et al., 1999]. С помощью биохимического анализа был идентифицирован RxL пептидный участок на p27 и субстратах Cdk, распознаваемый гидрофобным отрезком на циклинах S-фазы. Подобный отрезок был обнаружен и в циклинах G₁-фазы, однако его форма отличалась от аналогичного в митотических циклинах [Petri E.T. et al., 2007; Takaki T. et al., 2009].

В 1995 были получены мыши, дефицитные по гену циклина D1. Эти исследования показали, что данные животные жизнеспособны и имеют незначительные аномалии развития. Позднее были получены мыши с дефицитом по одному или нескольким циклинам D-типа [Ciemerych M. et al., 2002; Kozar K. et al., 2004]. Отсутствие циклина D2 и D3 также не влияло на жизнеспособность животных. Мыши, дефицитные по циклину D2, характеризовались сниженной фертильностью, нарушением развития мозжечка и изменением митоген-зависимой экспансии периферических В

лимфоцитов [Sicinski P. et al., 1996]. Инактивация циклина D3 влияла на ранние стадии развития лимфоцитов в тимусе [Sicinska E. et al., 2003]. Проведенные исследования выявили, что изменения затрагивали только те ткани и органы, которые экспрессировали строго определенный подтип циклина D. На ранних этапах развития исключение одного из подтипов циклина D компенсировалось повышенной экспрессией других типов [Ciemerych M. et al., 2002].

Таблица 22

Содержание белков-регуляторов клеточного цикла в клетках линии Jurkat после воздействия 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 100 мкМ NOC-5	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 50 мкМ CORM-2	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 10 мМ NaHS	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 50 мкМ NaHS	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

Нельзя исключить также, что нормальное развитие некоторых линий клеток происходит независимо от циклинов D типа. Создание мышей, имеющих D1-/-D2-/-D3-/- фенотип, показало, что циклин-D-независимые клеточные циклы могут иметь место при развитии организмов [Kozar K. et al., 2004]. Указанные животные развивались до срока поздней гестации (эмбриональный день - 17,5) и умирали со значительными нарушениями сердца, комбинированными с анемией, что подтверждает высокую значимость циклинов D типа в развитии гемопоэтических клеток. Однако фибробласты, лишённые циклинов D типа, развивались нормально, но требовали более значительную митогенную стимуляцию для инициации

клеточного цикла, чем нормальные клетки. Исследования других регуляторов клеточного цикла, включая циклин Е и А, Cdk4, Cdk6 и Cdk2, показали, что данные молекулы не реагируют на отсутствие циклина D [Malumbres M. et al., 2004; Sherr C.M., Roberts J.M., 2004].

Повышенная экспрессия циклина D1 отмечается при многих опухолевых заболеваниях и является результатом амплификации соответствующего гена или транслокаций данного гена на хромосому 11q13 [Kim Y.T., Zhao M., 2005]. Роль циклина D в онкогенезе подтверждена также исследованиями с вовлечением трансгенных мышей, у которых повышение экспрессии циклина D1 сопровождалось раком эпителия. Животные с отсутствием циклина D1 или Cdk4 были резистентны к раку груди, вызываемому ErbB2 онкогеном или повышенной экспрессией с-тус, тем самым подчеркивая важную роль циклина D1 в неопластической трансформации [Landis M.V. et al., 2006].

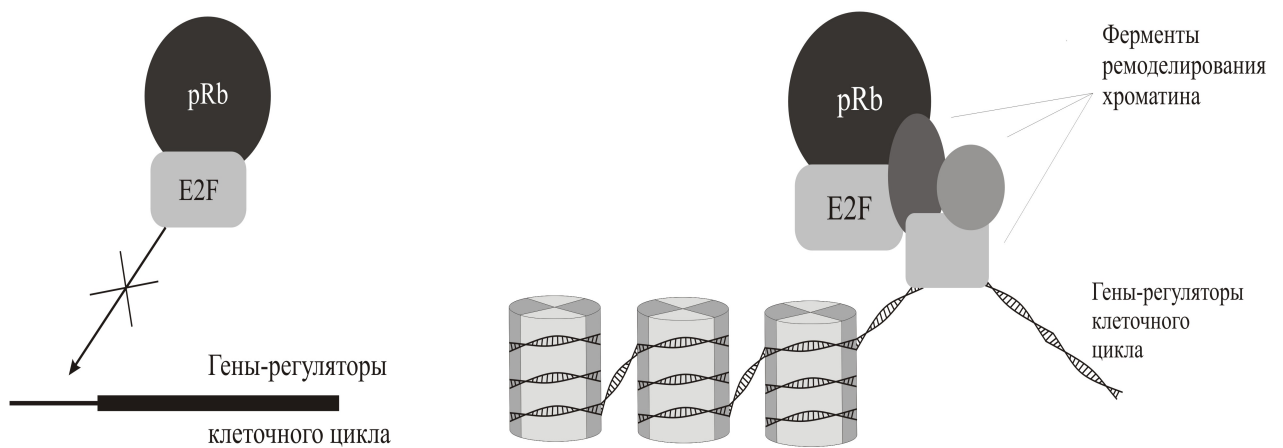
Нами было показано, что донор сульфида водорода NaHS в концентрации 50 мкМ снижает содержание белка циклина D1 [0,72(0,63-0,74) усл.ед.] относительно такового в интактной культуре клеток линии Jurkat [9,83(8,74-15,58) усл.ед.] ($p < 0,05$). Доноры оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода (10 мМ) вызывали увеличение уровня циклина D1, по сравнению с интактными клетками, до 113,47(91,43-117,28); 22,45(21,89-34,22) и 31,09(27,84-36,48) усл.ед., соответственно ($p < 0,05$) (табл.22).

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]. С использованием метода вестерн-блоттинга нами было определено содержание белка p21 в интактных клетках линии Jurkat и после воздействия на них доноров газов оксида азота, монооксида углерода и сульфида

водорода. Уровень данного протеина в клетках, не подверженных влиянию экзогенных газовых трансммиттеров, составил 17,77(13,92-20,96) усл.ед. При этом 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) [(13,96(12,53-15,38), 18,86(17,48-28,45), 12,32(12,00-13,31) и 14,82(13,90-15,76) усл.ед., соответственно)] ($p>0,05$) (табл.22). Полученные данные свидетельствуют о том, что задержка клеток в G₁-фазе клеточного цикла под воздействием доноров газов не обусловлена ингибирующим влиянием белка p21 на активированные комплексы циклин/циклин-зависимая киназа.

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]. Арест осуществляется за счет взаимодействия Rb белка с протеинами-мишенями семейства E2F транскрипционных факторов [Wong S., Weber J.D., 2007]. Rb ингибирует транскрипционные активаторы за счет образования комплекса E2F и инактивации промотерных элементов [Siddiqui H. et al., 2007]. Было продемонстрировано, что белок ретинобластомы является транскрипционным репрессором экспрессии генов, транскрибируемых РНК полимеразой I и III [White R.J. et al., 1996].

Прямое связывание белка ретинобластомы с транскрипционным доменом E2F блокирует его способность активировать транскрипцию (рис.27). В комплексе с E2F Rb связывается с промотерными регионами и активно репрессирует транскрипцию генов. Указанное активное вовлечение Rb в транскрипционные процессы является ключевым механизмом Rb-опосредованного транскрипционного ареста [Xiao B. et al., 2003].



Транскрипционная репрессия
за счет ингибирования активности E2F

Рис. 27 Молекулярный механизм связывания pRb с транскрипционным фактором E2F [по данным M.Poznic, 2009]

Было продемонстрировано, что блокирование связывания комплекса Rb-E2F с генами-мишенями достаточно для предотвращения Rb-ассоциированной супрессии клеточного роста; активная репрессия за счет связывания с нуклеосомами является самым важным механизмом ареста клеточного цикла белком ретинобластомы [He S.et al., 2000]. В начале G₁-фазы pRb становится фосфорилированным, что приводит к распаду комплексов с гистондеацетилазой (HDAC) и высвобождением транскрипционных факторов E2F-1 и DP-1, которые участвуют в позитивной регуляции генов. Их продукты отвечают за прогрессию S-фазы, включая циклин A, E, CDC 25. pRb остается гипофосфорилированным до конца клеточного цикла и Cdk2-циклин E комплекс участвует в поддержании этого гипофосфорилированного состояния. Cdk2-циклин E комплекс фосфорилирует гистон H1, активность которого необходима для репликации ДНК. Циклин A-зависимые киназы регулируют инициацию репликации ДНК за счет фосфорилирования ДНК-полимераза-альфа-праймазы. Фосфорилированный Rb присутствует в клетках на протяжении всего цикла деления клеток, нефосфорилированный и незначительно фосфорилированный белок представлен в клетках только в течение G₁-фазы.

Дефосфорилирование представляет собой поэтапный процесс аккумуляции частично дефосфорилированных форм Rb в клетках после завершения митоза [Rubin E. et al., 2001].

В нашей лаборатории было установлено, что содержание pRb в клетках Т-лимфобластной лейкемии после инкубации с NaHS в концентрации 50 мкМ составило 7,32(6,90-8,25) усл.ед., что оказалось достоверно ниже его уровня в контроле (9,83(9,22-14,96) ($p < 0,05$). Следовательно, сульфид водорода в данной концентрации вызывает остановку клеток в G_1 -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 [(36,87(30,92-42,80); 22,78(21,45-32,02); 24,16(23,05-25,11) и 9,83(9,22-14,96) усл.ед, соответственно)] ($p < 0,05$) (табл.22). При этом содержание Cdk4 при действии доноров газотрансмиттеров не изменялось, однако, возрастание содержания циклина D1, являющегося активатором данного фермента, резко увеличивалось при инкубации клеток с донорами газов оксида азота, монооксида углерода и сульфидом водорода в концентрации 10 мМ. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что в условиях повышения внутриклеточной концентрации доноров газов NO и CO происходит эффективное образование комплексов циклин D1/Cdk4, о чем свидетельствует повышение содержания фосфорилированного белка ретинобластомы, как продукта ферментативной деятельности активированной Cdk4. Однако, несмотря на фосфорилирование Rb, нами было отмечено замедление перехода клеток из G_1 - в S-фазу клеточного цикла при действии вышеперечисленных газов.

В настоящее время опубликованы работы, свидетельствующие о том, что остановка прогрессии клеточного цикла возможна после отмены

репрессорного влияния Rb на транскрипционные факторы E2F. Показано, что белок ретинобластомы является транскрипционным репрессором экспрессии генов, транскрибируемых РНК полимеразой I и III. При этом ингибирование POLR1A гена, кодирующего каталитическую субъединицу РНК полимеразы I, вызывало остановку прогрессии G1 фазы клеточного цикла при высоком уровне фосфорилированного Rb [Donati G. et al., 2011].

Возможно, доноры NO, CO и высокая концентрация H₂S обладают ингибирующим влиянием на экспрессию данного гена. Кроме того, ранее нами было показано, что доноры указанных веществ вызывают увеличение продукции АФК в клетках. Последние могут разрывать фосфодиэстеразные связи, лежащие в основе двухспиральной ДНК. Когда два подобных разрыва располагаются близко друг к другу, на противоположных спиралях ДНК возникают, так называемые, двойные разрывы ДНК, обязывающие клетку пройти процесс репарации. Активация PI(3)K (фосфотидилинозитол-3-ОН киназы)-подобных киназ (PIKKs), ATM (атаксия телеангиэктазия мутированная) и ATR(ATM- и Rad3-опосредованная) киназ является первой ступенью запуска сигнальных каскадов, ингибирующих прогрессию клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК. ATM киназа в основном активируется при разрывах ДНК, ATR киназа ответственна за арест репликационных вилок ДНК. Поскольку большинство ДНК повреждающих агентов приводят как к прямому повреждению данной молекулы, так и к аресту репликации, ATM и ATR участвуют одновременно в комплексном ответе на стрессовые воздействия.

Остановка клеток в G1 фазе клеточного цикла (основная сверочная точка) может происходить в результате активации ATM(ATR)/CHK2(CHK1)–p53/MDM2-p21 пути. Последний предполагает прямое фосфорилирование p53 за счет ATM(ATR), а также фосфорилирование убиквитин-лигазы MDM2, ответственной за ингибирующее связывание транскрипционного фактора p53. Данные события приводят к стабилизации и аккумуляции p53, который транскрипционно активирует p21, препятствующий

фосфорилированию pRb [Kasten M., Bartek J., 2004]. Однако нами было показано, что данный путь не является причиной остановки клеток в G₁-фазе клеточного цикла при действии оксида азота, монооксида углерода и сульфида в концентрации 10 мМ. В поздней G₁-фазе за счет активации E2F S-фазу промотирующих транскрипционных факторов экспрессия ATR и CHK1 увеличивается. Также индуцируется экспрессия активатора циклин E/Cdk2 киназы CDC25A фосфатазы. Комплекс ATR/CHK2 за счет фосфорилирования определенных сериновых остатков в молекуле CDC25A регулирует содержание данного фермента посредством убиквитин-зависимого, протосомо-опосредованного разрушения. В ответ на генотоксический стресс данный физиологический механизм усиливается при повышении активности CHK1 и CHK2, приводя к снижению содержания CDC25A с последующим ингибированием комплекса циклин E(A)/CDK2 [Kasten M., Bartek J., 2004]. Возможно, именно активация вышеописанного пути ответственна за остановку клеток линии Jurkat в G₁-фазе клеточного цикла при действии доноров оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода в концентрации 10 мМ.

Таким образом, торможение G₁-фазы клеточного цикла клеток Т-лимфобластной лейкемии при воздействии 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). Полученные нами данные об увеличении числа клеток в G₁-фазе на фоне возрастания содержания протеинов, промотирующих прогрессию данного этапа клеточного цикла, свидетельствуют о том, что газы обладают генотоксическим эффектом, и задержка клеток в G₁-фазе необходима для устранения полученных дефектов. Донор сульфида водорода в концентрации 50 мкМ вызывал специфические изменения соотношения белков-регуляторов

клеточного цикла, приводящее к задержке клеток в G₁-фазе. Таким образом, сульфид 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 (рис.28).

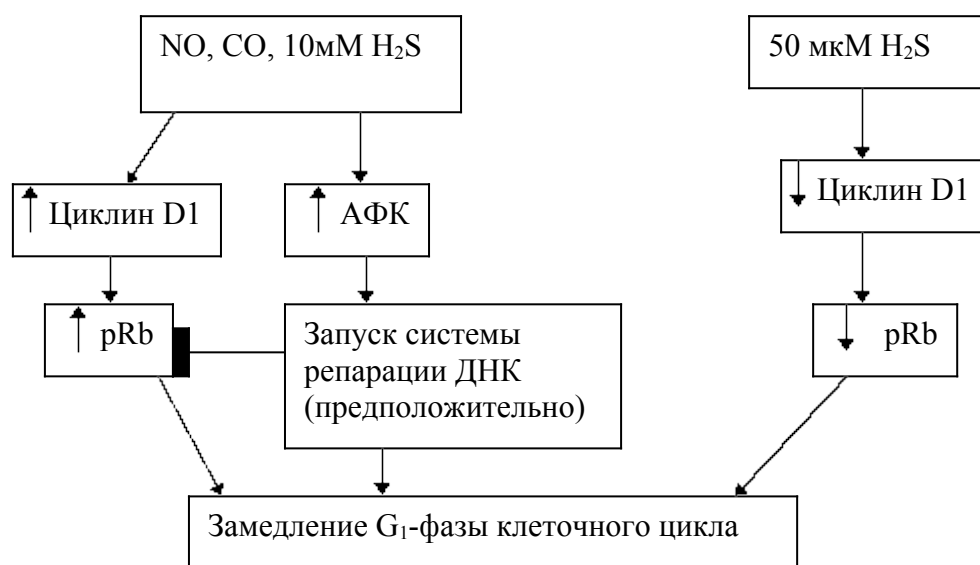


Рис.28 Молекулярные механизмы влияния доноров газовых трансмисмитеров на прогрессию G₁-фазы клеточного цикла клеток линии

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

Важнейшие клеточные функции, к числу которых относятся апоптоз, пролиферация и синтез цитокинов, определяются 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 воздействии доноров газовых транскрипторов, нами был проведен РТ-ПЦР анализ экспрессии мРНК генов, кодирующих изучаемые протеины. Также нами был изучен вклад p38 MAPK-опосредованного фосфорилирования в изменение соотношения протеинов, участвующих в регуляции программированной гибели клеток и прогрессии фаз клеточного цикла.

Необходимо отметить, что воздействие SNP в концентрации 100 мМ сопровождалось снижением экспрессии всех изучаемых генов (*bcl-2*, *bcl-XL*, *xiap*, *aven*, циклин D1), за исключением редокс-чувствительных p21, *bax*. Инкубирование клеток линии Jurkat с SNP в концентрации 100 мМ приводило к возрастанию уровня мРНК p21 до 0,72(0,65-0,80) усл.ед., по сравнению с аналогичными параметрами в интактных клетках [0,04(0,01-0,06) усл.ед.] ($p < 0,05$). Нами не было выявлено изменений уровня экспрессии гена *bad* [3,20(3,0-3,40) усл.ед.] относительно такового в контрольной культуре - 3,10(2,47-3,19) усл.ед ($p > 0,05$) (табл.23).

Инкубация клеток линии Jurkat в концентрации 10 мМ привела к снижению уровня экспрессии мРНК генов *bcl-2*, *bcl-X_L*, *xiap*, *aven*, 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 до 0,42(0,37-0,50) усл.ед., по сравнению с таковым в интактных клетках 0,04(0,01-0,06) усл.ед. ($p < 0,05$). Экспрессия мРНК гена *Bad* не изменялась относительно контрольных значений после инкубации клеток Т-лимфобластной лейкемии с донором сульфида водорода в концентрации 10 мМ [3,10(2,47-3,19) усл.ед. и 3,75(3,50-3,93) усл.ед, соответственно] ($p > 0,05$) (табл.23).

Действие на клетки Т-лимфобластной лейкемии NOC-5 в концентрации 100 мкМ приводило к резкому (13-кратному) повышению экспрессии гена *bad* [39,80(20,37-49,19) усл.ед.], а также к возрастанию уровня экспрессии p21 до 0,51(0,47-0,55) усл.ед., по сравнению с соответствующим значением в интактных клетках линии Jurkat [3,10(2,47-3,19) и 0,04(0,01-0,06) усл.ед.,

соответственно] ($p < 0,05$). Уровень экспрессии мРНК гена *Aven* оставался на уровне такового в контроле при воздействии 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 ($p < 0,05$) (табл.23).

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 составил 0,52(0,46-0,59) усл.ед., что достоверно превышало таковой в контрольной группе - 0,04(0,01-0,06) усл.ед. ($p < 0,05$). Действие на клетки CORM-2 не вызывало изменений в уровне экспрессии генов *aven* и *bcl-2* относительно интактных клеток ($p > 0,05$) (табл.23).

Таким образом, нами было отмечено повышение экспрессии гена, кодирующего белок p21 в клетках всех экспериментальных моделей. Данный факт можно объяснить увеличением уровня АФК и активацией транскрипционного фактора p53 при воздействии на клетки линии Jurkat SNP в концентрации 100 мМ, NOC-5 в концентрации 100 мкМ, NaHS в концентрации 10 мМ и CORM-2 в концентрации 50 мкМ.

Уровень экспрессии гена *bad* оставался неизменным относительно контроля при действии SNP в концентрации 100 мМ и NaHS в концентрации 10 мМ. H.J. Lee et al. (2012) было показано, что доноры сульфида водорода и оксида азота увеличивают внутриклеточное содержание белка mTORC1. Последний обладает способностью, связываясь с транскрипционным фактором eIF4A, регулировать инициаторную фазу и фазу элонгации трансляции, тем самым стабилизируя мРНК таких генов как *puma* и *bad* [Lam D. et al., 2009]. Нами было показано, что 24-х часовое воздействие оксида азота приводило к резкому увеличению мРНК гена *bad*.

Таблица 23

Экспрессия мРНК генов, кодирующих белки-регуляторы апоптоза и клеточного цикла, при воздействии на клетки линии Jurkat доноров газовых трансмиттеров, 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 хіар, 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 воздействия 100 мМ SNP	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 воздействия 100 мМ SNP 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 воздействия 100 мкМ NОC-5	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 100 мкМ NОC-5 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
Клетки после воздействия 50 мкМ CORM-2	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 воздействия 50 мкМ CORM-2 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

Продолжение таблицы 23

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 авen, усл.ед.	Экспрессия гена xiap, усл.ед.	Экспрессия гена p21, усл.ед.	Экспрессия гена циклин D1, усл.ед.
Клетки после воздействия 10 mM NaHS	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 воздействия 10 mM NaHS и 0,2 мкМ 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 50 мкМ NaHS	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

Данный факт подтверждает описанный выше механизм, когда кратковременное воздействие газов стабилизировало мРНК указанного гена на уровне контроля, а продолжительное воздействие NO приводило к её внутриклеточной аккумуляции. Возможно, стабилизация мРНК является причиной сохранения уровня экспрессии авен на таковом в интактных клетках Т-лимфобластной лейкемии при воздействии на них NOC-5 и CORM-2.

В литературе существуют многочисленные данные, свидетельствующие о возможности специфической регуляции экспрессии генов газовыми трансммиттерами за счет активации ряда транскрипционных факторов. Установлено, что NO изменяет ДНК-связывающую активность многих цинксодержащих транскрипционных факторов за счет S-нитрозилирования тиоловых групп цистеина и последующего формирования S-нитротииолов, что служит пусковым механизмом трансдукции сигнала [Осипов А.Н., 2010]. Путем S-нитрозилирования может регулироваться функция многих тиолсодержащих ферментов, включая транскрипционные факторы NF-кВ, AP-1 и CREB [Thomas D.D. et al., 2008]. Показано, что NF-кВ может быть напрямую заингибирован оксидом азота за счет S-нитрозилирования р50 субъединицы. Данная модификация препятствует связыванию р50 со специфическим сайтом ДНК. NO обладает также способностью стабилизировать ингибитор NF-кВ – IкВ α , предотвращая его отщепление от указанного транскрипционного фактора. Оксид азота усиливает экспрессию IкВ α , но не субъединиц NF-кВ р65 и р50, что позволяет предполагать наличие специфического механизма регуляции экспрессии IкВ α при действии NO [Hess D.T. et al., 2005].

Таким образом, можно предположить, что оксид азота замедляет экспрессию bcl-X_L, являющегося транскрипционной мишенью NF-кВ за счет ингибирования последнего. Однако нами было показано снижение экспрессии генов, не находящихся под транскрипционным контролем NF-кВ (bcl-2, циклин D1); при этом увеличение уровня мРНК отмечалось только для

редокс-зависимых генов. Обращало на себя внимание также снижение экспрессии генов при действии NaHS в концентрации 10 мМ и CORM-2 в концентрации 50 мкМ. Оба вещества имеют специфические механизмы регуляции транскрипционной активности. Так, сульфидирование под действием сульфида водорода в большинстве случаев увеличивает ферментативную и транскрипционную активность белков-мишеней [Mustafa A.K. et al., 2009]. Монооксид углерода не обладает ингибирующим влиянием на транскрипционные факторы, в отличие от нитрозилирующей инактивации при действии оксида азота. СО воздействует на активность ядерных транскрипционных факторов за счет связывания с гемом в активных центрах данных молекул [Piantodosi C.A., 2002].

Таким образом, учитывая данные литературы о влиянии газовых трансммиттеров на экспрессию генов, профиль экспрессии изучаемых генов представлялся разнонаправленным и специфичным для каждого изучаемого газа. Однако полученные однонаправленные одинаковые изменения позволяют предполагать наличие неспецифических механизмов модуляции экспрессии генов под влиянием газов. В пользу этой гипотезы выступают данные, полученные в результате изучения молекулярных механизмов регуляции клеточного цикла. Так, нами было установлено, что оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода в концентрации 10 мМ вызывают задержку клеток линии Jurkat в G₁-фазе клеточного цикла. При этом остановка прогрессии фаз цикла происходит не в результате изменения активности специфических регуляторных молекул, а, возможно, благодаря индукции системы репарации ДНК. Известно, что репарация ДНК является энергетически высоко затратным процессом. Возможно, угнетение экспрессии генов является следствием консолидации АТФ-ресурсов клетки на устранение полученных в результате воздействия газовых трансммиттеров повреждений. При этом нами было показано, что действие в концентрации 50 мкМ не сопровождалось увеличением АФК продукции и изменением экспрессии редокс-чувствительного гена p21 относительно контроля

($p > 0,05$). Уровень экспрессии циклина D1 и содержание соответствующего протеина снижались при действии сульфида водорода в данной концентрации, что позволяет сделать вывод о том, что модуляция экспрессии циклина D1 обязана специфическим транскрипционным механизмам.

Полученные в результате исследования данные о внутриклеточном содержании белков-регуляторов апоптоза и клеточного цикла свидетельствуют о том, что уменьшение экспрессии генов не приводило к снижению содержания соответствующих протеинов, за исключением белка p21, содержание которого не изменялось, несмотря на повышение экспрессии соответствующего гена (табл.22, 23).

Возможно, газовые трансммиттеры одновременно с повышением экспрессии указанного гена запускают механизмы, приводящие к посттранскрипционной деградации образующейся мРНК. Содержание протеина Bcl-X_L после действия на клетки линии Jurkat донора монооксида углерода снижалось относительно такового в контроле. Причиной указанного снижения уровня данного протеина является угнетение экспрессии соответствующего гена. Содержание других белков при действии NOC-5 в концентрации 100 мкМ, SNP в концентрации 100 мМ, CORM-2 в концентрации 50 мкМ и NaHS в концентрации 10 мМ оставалось либо на уровне контроля, либо повышалось (рис. 20, 21, 22, 23).

На примере белка Bcl-2 было показано, что S-нитрозилирование данного протеина предотвращает его деградацию через убиквитин-протеасомальный путь [Azad N. et al., 2006]. Возможно, в случае действия доноров оксида азота накопление белков может происходить благодаря неспецифическому окислению данных молекул АФК. Нами было обнаружено, что воздействие на клетки SNP сопряжено с 8-ми кратным повышением продукции АФК, а также с митохондриальной дисфункцией. Последняя может являться причиной наработки таких сильных окислителей как супероксид аниона, гидроксил радикал, пероксинитрит и оксид азота (IV) (NO₂). Повышение содержания данных веществ может приводить к

необратимым окислительным модификациям белков (3-нитротирозин, карбонилы белков). Обе используемые нами концентрации доноров оксида азота приводят к увеличению содержания белка χ IAP 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.

Нитрозилированию присущи все основные черты биологического сигнала: во первых, S-нитрозилирование является быстрой реакцией, позволяющей передавать сигналы по мере физиологической необходимости, во-вторых, присутствие специфического участка в структуре белков, способных к S-нитрозилированию, в-третьих, отмечена колокализация протеинов-мишеней с источником оксида азота, в-четвертых, обратимость реакции и ферментативный контроль (глутатион редуктаза, тиреодоксин контролируют степень S-нитрозилирования) [Foster M.W. et al., 2003; Hess D.T. et al., 2005; Iwakiri Y. et al., 2006; Nakamura T., Lipton S.A., 2008]. Возможно, в случае циклина D1 S-нитрозилирование также является причиной замедления деградации указанного протеина в клетках, что и объясняет многократное повышение содержания указанного белка после воздействия на клетки линии Jurkat донора NO. Повышение содержания белка Bad при инкубации клеток с NOC-5 опосредовано увеличением уровня экспрессии мРНК соответствующего гена, возможно, в результате снижения деградации указанной мРНК.

В проведенном нами исследовании было установлено, что при воздействии на клетки донора монооксида углерода происходит достоверное увеличение уровня белков Bad и циклина D1 относительно значений аналогичных показателей в интактных клетках линии Jurkat ($p < 0,05$). Увеличение этого внутриклеточного 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 10 mM NaHS приводила к увеличению содержания белков Bcl-2, Bad и циклина D1 относительно контрольных значений. Возможно, увеличение 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]. Поскольку сульфид водорода обладает мощными антиоксидантными свойствами, эксперименты с использованием экзогенных окислителей не давали четкого ответа на вопрос о возможности существования данной реакции в живых системах. Нами показано, что наработка АФК при действии сульфида водорода в концентрации 10 mM (о кратковременной продукции АФК свидетельствует как зарегистрированное нами с помощью ДХФ-ДА повышение уровня H_2O_2 , так и активация редокс-зависимых систем) сопровождается аккумуляцией в клетке ряда белков. Внутриклеточное накопление данных протеинов может являться следствием нарушения их деградации в результате химической модификации, возможно, реакции сульфгидрирования. Т.е. в нашем исследовании впервые приведены косвенные доказательства того, что реакция сульфгидрирования, требующая окислительный эквивалент для реализации, может протекать в живых клетках. Окислителями могут выступать супероксид анион и перекись водорода, постоянно генерируемые в клетках. Так, перекись водорода продуцируется не только в митохондриях, но и в пероксисомах и цитозоле с участием СОД, NADPH оксидаз, ксантиноксидаз, сульфгидрилоксидаз и моноаминоксидаз [Bae Y.S. et al.,

2011]. При физиологических условиях большинство тиоловых групп цистеина протонированы (-SH) и потому обладают низкой реакционной способностью связывания с H_2O_2 . Однако, в некоторых протеинах цистеиновые остатки фланкированы основными аминокислотами, и цистеиновые SH-группы имеют высоко реакционно-способный тиолат анион (-S⁻). Данный элемент может специфически подвергаться H_2O_2 -опосредованному S-сульфгидрированию [Jones D.P., 2008.; Nagy P., Winterbourn C.C., 2010 (a)]. Возможно, сульфгидрирование играет важную роль в регуляции жизнедеятельности нейтрофилов, образующих гипохлорную кислоту в качестве окислительного эквивалента для реакции сульфгидрирования [Nagy P., Winterbourn C.C., 2010 (b)].

A.K. Mustafa et al. (2009) показали, что сульфгидрированию SSH групп цистеина подвержено большое число протеинов млекопитающих. При этом сульфгидрирование ферментов приводит к индукции их функциональной активности. Сульфгидрирование GAPDG по цистеину-150, ответственного за каталитическую активность данного фермента, индуцирует активность энзима на 700%. Подобная регуляция имеет физиологическую значимость. Так, у CSE нокаутных мышей активность GAPDG в печени была снижена на 30% при неизменном уровне указанного белка. Было показано также, что актин-зависимая полимеризация усиливается при сульфгидрировании. Показано, что от 10 до 25% эндогенного GAPDG, β -тубулина и актина сульфгидрировано на базальном уровне. Возможно, данной реакцией опосредовано большинство физиологических эффектов сульфида водорода. Поскольку сульфгидрированию может быть подвержена большая масса протеинов млекопитающих и, таким образом, существенно изменяется их активность, данная реакция может представлять собой новый механизм посттрансляционной модификации белков [Mustafa A.K. et al., 2009].

Нами было показано, что увеличение концентрации ряда белков-регуляторов апоптоза и клеточного цикла обусловлено их

посттрансляционной модификацией и не зависит от экспрессии соответствующих генов. Поскольку нами было установлено, что стресс-активируемая протеин-киназа p38 вовлечена в регуляцию апоптоза при действии на клетки линии Jurkat доноров газовых транзмиттеров, мы предположили, что фосфорилирование протеинов также может вносить вклад в посттрансляционные механизмы изменения содержания белков, тем самым участвуя в модуляции апоптотической реакции. 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 транзмиттеров. 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.

Так, содержание Bcl-2 снизилось при ингибировании p38 MAPK-зависимых путей сигнальной трансдукции действия 100 мМ NO до 8,86(7,95-9,76) усл.ед. относительно аналогичного результата инкубации клеток линии Jurkat только с SNP [17,65(12,72-21,50) усл.ед.] ($p < 0,05$), не достигая при этом контрольных значений 2,17(1,87-2,48) усл.ед. ($p < 0,05$). Сочетанное воздействие SB203580 и SNP приводило к уменьшению содержания xIAP до 8,09(6,98-9,20) усл.ед., по сравнению с изолированным действием SNP и контролем [21,47(20,31-28,44) и 15,57(14,29-16,84) усл.ед., соответственно] ($p < 0,05$). При этом p38 MAPK, являлась негативным регулятором содержания Bad и Bcl-X_L, поскольку содержание данных протеинов статистически значимо увеличивалось до 8,18(7,48-8,89) и 16,09(16,04-16,14) усл.ед., соответственно, относительно изолированного действия газа [1,14(0,47-1,71) и 12,35(10,34-14,60) усл.ед., соответственно] ($p < 0,05$). Ингибирование p38 MAPK зависимых путей действия SNP не влияло на содержание протеина Aven в клетках линии Jurkat, по сравнению с SNP-инкубированными клетками [1,41(0,87-2,12) и 1,75(1,27-2,23) усл.ед., соответственно] ($p > 0,05$).

Необходимо отметить, что p38 MAPK не влияла на SNP-опосредованное угнетение экспрессии генов. Экспрессия гена *bcl-2* составила 4,89(4,35-5,51) усл.ед, *bad* – 2,06(2,20-2,09) усл.ед., *bcl-X_L* 2,73(2,46-3,28) усл.ед., *xiap* 0,92(0,73—1,35) усл.ед., *aven* 0,45(0,37-0,46) усл.ед., что достоверно не отличалось от соответствующих параметров при изолированном действии SNP [3,78(3,76-3,80); 3,20(3,00-3,40); 1,83(1,74-1,92); 0,24(0,21-0,27) и 0,31(0,30-0,32) усл.ед, соответственно] ($p>0,05$).

Значения экспрессии указанных генов (*bcl-2*, *bad*, *bcl-X_L*, *xiap*, *aven*) также не изменялись [0,89(0,49-1,08); 37,39(31,86-43,12); 1,86((1,14-1,96); 0,55(0,38-0,46) и 1,22(0,74-1,71) усл.ед., соответственно] в NOC-5+p38 MAPK-обработанных Jurkat клетках относительно соответствующих значений в NOC-5-обработанной культуре [0,79(0,72-0,98); 39,80(20,37-49,19); 1,13(0,98-1,26); 0,28(0,23-0,38) и 2,28(1,68-2,86)] ($p>0,05$). Ингибирование p38 MAPK не отражалось на содержании белков *Bad* [3,88(3,82-4,13) усл.ед.] и *Bcl-X_L* [12,90(12,11-13,67) усл.ед.] в условиях воздействия на клетки Т-лимфобластной лейкемии 100 мкМ донора оксида азота [3,00(2,91-3,33); 10,98(9,86-11,71) усл.ед., соответственно] ($p>0,05$). При этом уровни протеинов *xIAP* и *Aven*, повышенные относительно контроля при изолированном действии NOC-5 [21,68(20,63-22,05) и 3,87(3,71-4,38) усл.ед.] снижались до 11,02(9,56-11,90) и 0,25(0,25-0,25) усл.ед., соответственно ($p<0,05$) (рис.21, 26). Таким образом, отмена фосфорилирования при действии оксида азота приводила к снижению содержания данных белков, возможно, за счет повышения деградации нефосфорилированных форм. Полученные результаты опровергают высказанное нами ранее предположение о том, что нитрозилирование *xIAP* и *Aven* играет ведущую роль в повышении содержания данных протеинов при инкубации клеток с донорами оксида азота. Следовательно, посттрансляционная модификация, лежащая в основе увеличения уровня *xIAP* и *Aven*, требует как минимум двух факторов – повышенного содержания оксида азота и функционирующей p38 MAPK.

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. Так, содержание Bcl-2 составило 15,07(13,68-16,46) усл.ед., Bad – 27,34(22,73-31,95) усл.ед., Bcl-X_L – 9,08(7,05-11,12) усл.ед., xIAP – 65,70(51,47-79,93) усл.ед., что достоверно превосходило аналогичные параметры при изолированном действии газа [1,13(0,80-1,47); 7,33(5,99-8,67); 1,23(0,86-1,59); 9,25(5,53-12,98) усл.ед., соответственно] ($p < 0,05$). Культивирование клеток линии Jurkat с CORM-2 в концентрации 50 мкМ не приводило к достоверным изменениям содержания Aven относительно такового при совместном культивировании клеток с селективным ингибитором p38 MAP киназы [1,28(1,25-1,31) и 2,26(1,97-2,55) усл.ед., соответственно] ($p > 0,05$). 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. Экспрессия мРНК гена bcl-2 не изменялась относительно действия донора газа [4,04(4,01-5,29) и 2,90(1,51-4,78) усл.ед, соответственно]. При этом повышалась экспрессия генов bad – до 1,81(1,72-2,49), bcl-X_L – до 6,95(5,88-6,96) усл.ед., xiap – до 4,89(3,48-4,98) усл.ед., aven – до 4,92(4,87-5,86) усл.ед после обработки клеток SB203580 относительно соответствующих показателей после изолированного действия донора монооксида углерода [1,24(0,75-1,64), 3,36(2,92-3,99), 1,14(0,82-1,58), 2,71(1,85-3,57) усл.ед., соответственно] ($p < 0,05$) (рис.22, 26). Следовательно, 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. В литературе показано, что p38 играет ключевую роль в СО-зависимом изменении клеточных функций. При этом известно, что данная киназа не имеет гема в своей структуре и факт активации p38 MAPK

за счет монооксида углерода оставался не объясненным. Полученные нами данные позволяют предполагать следующую цепочку событий: СО, связываясь с гемом в составе белковых комплексов митохондрий, нарушает окислительное фосфорилирование, что приводит к наработке АФК, недостаточной для самостоятельной модификации белковых структур, но приводящей к активации p38 MAPK. Последняя опосредует большинство полученных нами изменений, происходящих при обработке клеток донором монооксида углерода (изменение экспрессии генов, повышение содержания белков, активация апоптоза).

p38 MAPK играла ключевую роль в изменении содержания белка Bcl-2 при действии на клетки сульфида водорода. Так, содержание данного протеина при ингибировании p38 MAPK снижалось относительно такового при изолированном действии газа, достигая значений, не отличающихся от соответствующего показателя в интактных клетках [2,54(1,44-3,64); 2,17(1,87-2,48) и 11,26(10,25-13,46) усл.ед., соответственно] ($p < 0,05$). Данное событие происходило на фоне неизменного уровня экспрессии гена bcl-2 в NaHS- и NaHS+SB203580-обработанных клетках [2,68(1,94-3,17) и 2,63(2,46-3,50) усл.ед., соответственно] ($p > 0,05$). Воздействие ингибитора p38 MAPK не изменяло экспрессию генов *xiar* и *aven* [0,17(0,16-0,20) и 0,40(0,36-0,53) усл.ед., соответственно], по сравнению с соответствующими значениями в клетках с действующей p38 MAPK в условиях повышения внутриклеточной концентрации сульфида водорода [0,20(0,19-0,21) и 0,26(0,22-0,28) усл.ед., соответственно] ($p > 0,05$). Уровень экспрессии генов *bad* снижался до 1,36(1,27-1,59) усл.ед., а уровень bcl-X_L поднимался до 5,17(4,80-5,56) усл.ед. в NaHS+SB203580-обработанных клетках, относительно аналогичных параметров [3,75(3,50-3,93) и 1,57(1,39-1,76) усл.ед., соответственно] в клетках после изолированного действия газа ($p < 0,05$). При этом ингибирование p38 MAPK приводило к снижению содержания Bad до 2,22(2,12-2,32) усл.ед. относительно такового в NaHS-обработанных клетках 6,04(5,62-6,11) усл.ед. ($p < 0,05$). Однако содержание Bad оставалось выше

такового в интактных клетках ($p < 0,05$), что свидетельствует о том, что увеличение количества данного белка частично обусловлено сульфгидрированием. P38 MAPK не участвовала в регуляции содержания белка Bcl- X_L , о чем свидетельствовал неизменный уровень данного протеина [15,67(12,07-19,27) усл.ед.] относительно аналогичных параметров в клетках, обработанных только донором газа [14,29(12,86-16,34) усл.ед.] ($p > 0,05$). Таким образом, нарушения экспрессии вышеуказанных генов (bad и bcl- X_L) не определяли изменения содержания соответствующих белков, что свидетельствует о механизмах ускоренной деградации мРНК bcl- X_L и посттрансляционной модификации белка Bad на фоне снижения уровня экспрессии гена bad при повышении внутриклеточной концентрации сульфида водорода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов его действия. Уровень протеина Aven возрастал до 9,03(4,32-13,73) усл.ед. в NaHS+SB203580-обработанных клетках, по сравнению с таковым при изолированном действии газа 1,04(0,99-2,08) усл.ед. ($p < 0,05$). Содержание другого белка-ингибитора каспаз xIAP не изменялось после ингибирования p38 MAPK-зависимых сигнальных путей действия сульфида водорода [10,97(6,85-15,08) усл.ед.] относительно такового в NaHS-обработанных клетках [14,64(13,63-16,09) усл.ед.] ($p > 0,05$) (рис.23, 26).

Ингибирование p38 MAPK-зависимых путей сигнальной трансдукции не приводило к изменению содержания белков-регуляторов клеточного цикла при воздействии на клетки донора оксида азота относительно аналогичного параметра при изолированном действии газа. Так, при воздействии SB203580 содержание D1 составило 86,41(74,80-133,08) усл.ед., pRb – 33,72(32,64-34,95) усл.ед., Cdk4 – 8,93(8,02-9,47) усл.ед., p21 – 11,27(10,46-13,78) усл.ед., что не отличалось от соответствующих показателей при инкубации клеток с донором оксида азота [113,47(91,43-117,28); 36,87(30,92-42,80); 7,43(7,02-8,14) и 13,96(12,53-15,38) усл.ед., соответственно] ($p > 0,05$) (рис.30). Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение содержания белков циклина D1 и pRb относительно

аналогичных параметров в интактных клетках не обусловлено фосфорилированием и происходит при непосредственной модификации протеинов оксидом азота.

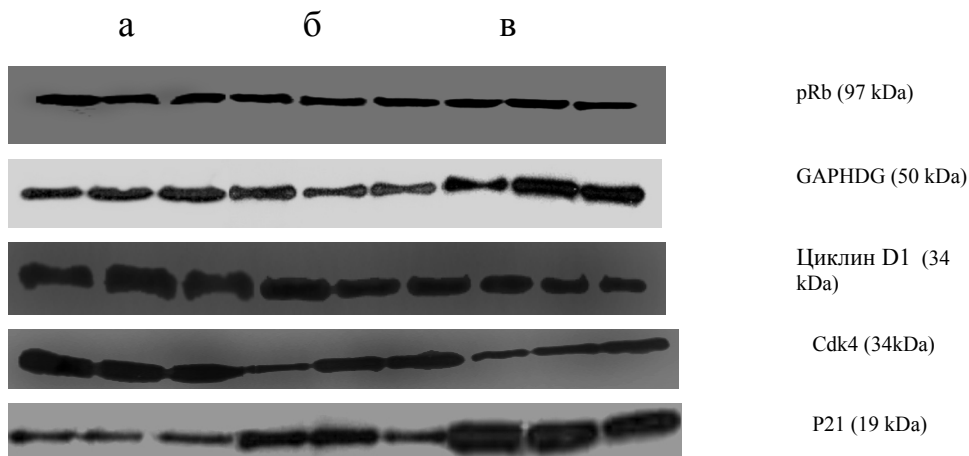


Рис.30 Содержание белков-регуляторов клеточного цикла при действии на клетки донора оксида азота: а - интактные клетки; б - клетки после воздействия NOC-5; в – клетки, обработанный SB203580 и NOC-5 в концентрации 100 мкМ.

Содержание белков циклина D1, pRb и p21 возрастало при ингибировании p38 MAPK-зависимых путей действия монооксида углерода до 62,55(48,40-72,17); 58,63(59,59-63,67) и 98,61(91,32-135,67) усл.ед. по сравнению с таковыми при изолированном действии газа [22,45(21,89-34,22); 18,86(17,48-28,45) и 22,78(21,45-32,02) усл.ед., соответственно] ($p < 0,05$). Очевидно, p38 MAPK является негативным регулятором уровня белков, участвующих в прогрессии фаз клеточного цикла. SB203580 не влиял на содержание циклин-зависимой киназы 4 при воздействии на клетки CORM-2 [9,06(8,43-9,87) и 8,18(7,82-8,54) усл.ед., соответственно] ($p > 0,05$) (рис.31).

Выключение p38 MAPK-зависимых путей передачи внутриклеточного сигнала при действии на клетки сульфида водорода в концентрации 50 мкМ не приводило к изменению уровня циклина D1 [0,61(0,58-0,72) усл.ед.] относительно такового в культуре клеток после изолированного действия газа [0,70(0,65-0,74) усл.ед., $p > 0,05$]. Ингибирование p38 MAPK также не влияло на содержание белков p21 и pRb в клетках, подверженных воздействию донора сульфида водорода. Так, уровень белка p21 составил 11,12(7,54-12,25) усл.ед., а pRb - 6,43(6,35-6,52)

усл.ед. при обработке клеток SB203580, что не отличалось от аналогичных показателей при действии на клетки только NaHS [12,31(12,03-13,31) и 7,34(6,90-8,25) усл.ед., соответственно] ($p>0,05$) (рис.32).

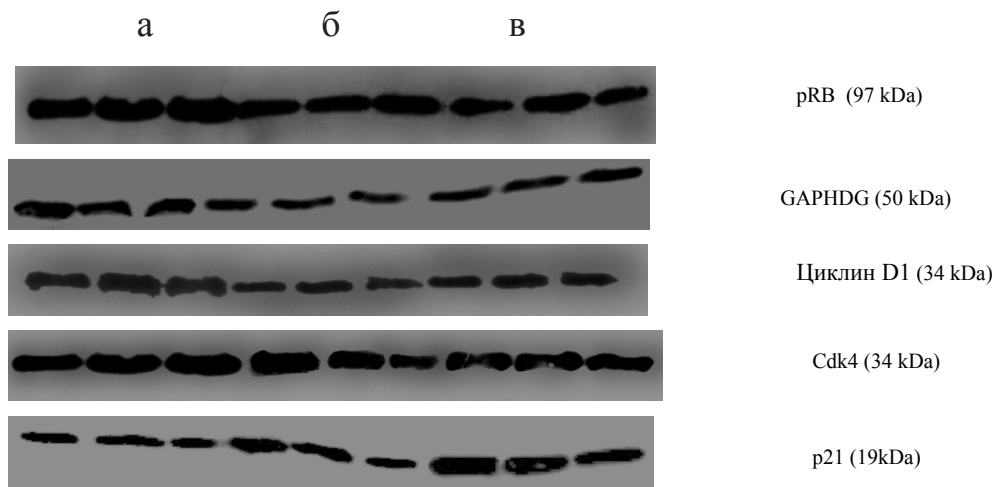


Рис.31 Содержание белков-регуляторов клеточного цикла при действии на клетки донора монооксида углерода: а - интактные клетки; б - клетки после воздействия CORM-2; в – клетки, обработанный SB203580 и CORM2 в концентрации 10 мМ.

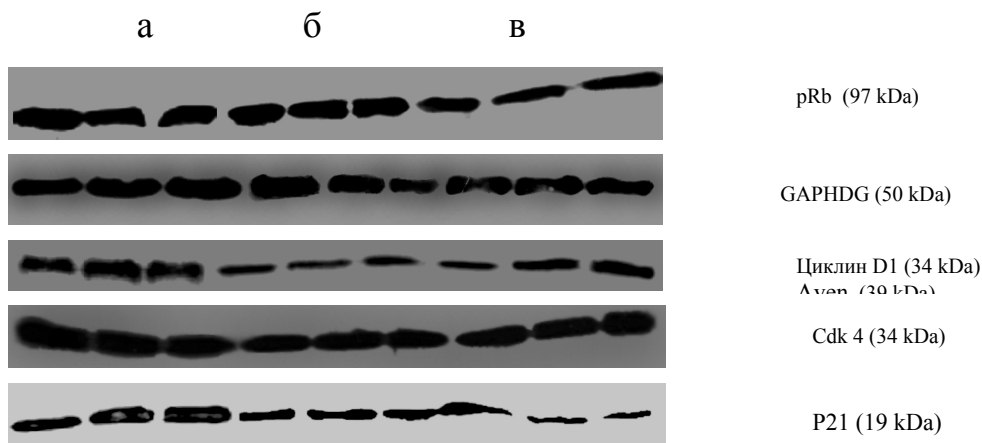


Рис.32 Содержание белков-регуляторов клеточного цикла при действии на клетки донора сульфида водорода: а - интактные клетки; б - клетки после воздействия NaHS; в – клетки, обработанный SB203580 и NaHS в концентрации 50 мкМ.

Таким образом, увеличение содержания белков при действии на клетки доноров газов оксида азота 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 монооксида углерода.

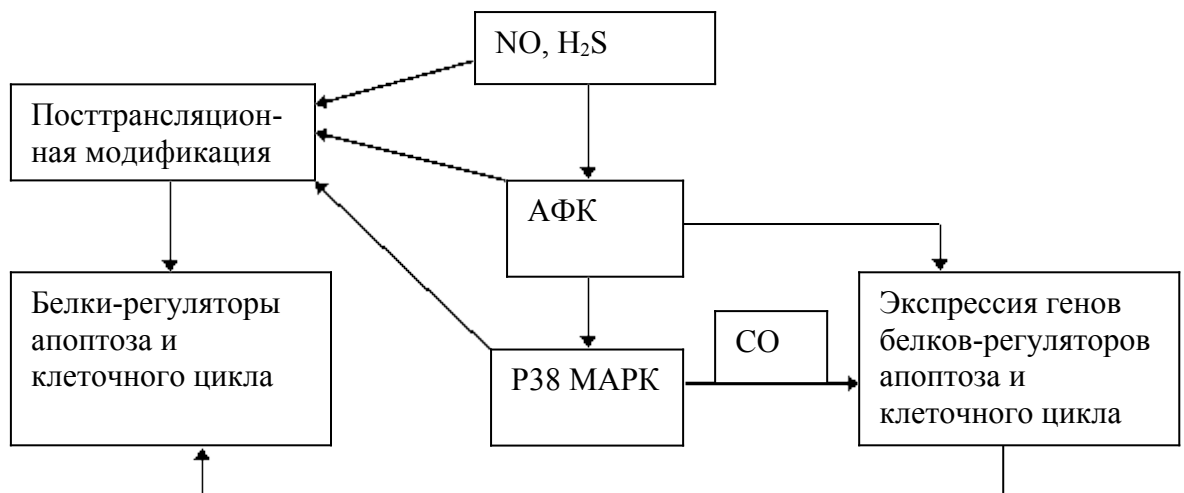


Рис.32 Молекулярные механизмы изменения содержания белков -регуляторов апоптоза и клеточного цикла в клетках линии Jurkat при действии доноров газов (оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода)

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

Снижение числа апоптотически-измененных клеток при выключении p38 MAPK-зависимых сигнальных каскадов свидетельствует о том, что сульфид водорода передает сигнал к апоптозу посредством p38 киназы. Последняя являлась проапоптотическим фактором при действии данного газа. Нами были получены результаты, свидетельствующие о том, что ингибирование p38 MAPK приводит к повышению активности каспазы 3 [2,08(1,99-2,13) усл.ед.] относительно соответствующих значений при изолированном действии газа [1,66(1,59-1,68) усл.ед., соответственно] ($p < 0,05$) на фоне отсутствия изменений со стороны числа клеток линии Jurkat со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом [16,2(15,0-21,5) и 8,4(7,8-12,6)%, соответственно, ($p < 0,05$)]. При этом отмечалось снижение числа клеток с признаками апоптоза в NaHS+p38 MAPK-обработанной культуре до 5,10(4,90-5,80)%, по сравнению с таковым в культурах, подверженных только воздействию сульфида водорода [9,70(8,83-14,90)%, ($p < 0,05$)] (табл.24). По всей видимости, p38 MAPK уменьшает (нивелирует) проапоптотическое действие H_2S , уменьшая

активность каспазы-3 (значение данного параметра возрастало при выключении p38).

В нашем исследовании было продемонстрировано, что сигнал к изменению содержания ряда белков семейства Bcl-2 передается с участием p38 MAPK при действии на клетки линии Jurkat H₂S. Так, увеличение содержания Bad при действии на клетки сульфида водорода зависело от p38 киназы. Поскольку количество указанного белка не опускалось до уровня такового в интактных клетках Т-лимфобластной лейкемии при действии на них ингибитора p38 MAPK и H₂S, возможно, существуют другие механизмы, приводящие к повышению содержания Bad при увеличении внутриклеточной концентрации сульфида водорода.

Сигнал к повышению содержания антиапоптотического белка Bcl-2 посредством H₂S передавался исключительно с участием p38 MAPK. Данный белок ингибирует пороформирующую активность проапоптотических белков семейства Bcl-2, стабилизируя митохондриальные мембраны и препятствуя падению $\Delta\psi$. Отмена повышения уровня Bcl-2 при ингибировании p38 MAPK может приводить к повышению числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом. В случае воздействия сульфида водорода p38 MAPK являлась посредником как про-, так и антиапоптотических изменений, в целом суммирующихся в угнетение апоптоза клеток линии Jurkat.

При ингибировании p38 MAPK происходило возрастание уровня белка Aven; следовательно, p38 киназа являлась негативным регулятором содержания данного протеина при действии донора сульфида водорода. Нами было показано, что ингибирование p38 MAPK-зависимых механизмов передачи сигнала с участием H₂S приводило к снижению активности каспазы 9 до 2,19(2,13-2,24) усл.ед. [при изолированном действии газа - 2,71(2,69-2,74) усл.ед., ($p < 0,05$)]. Увеличение содержания Aven может являться причиной нивелирования активности каспазы 9 при ингибировании p38 MAPK и угнетения апоптоза клеток при ингибировании p38 MAPK в

условиях повышения внутриклеточной концентрации сульфида водорода (рис.31).

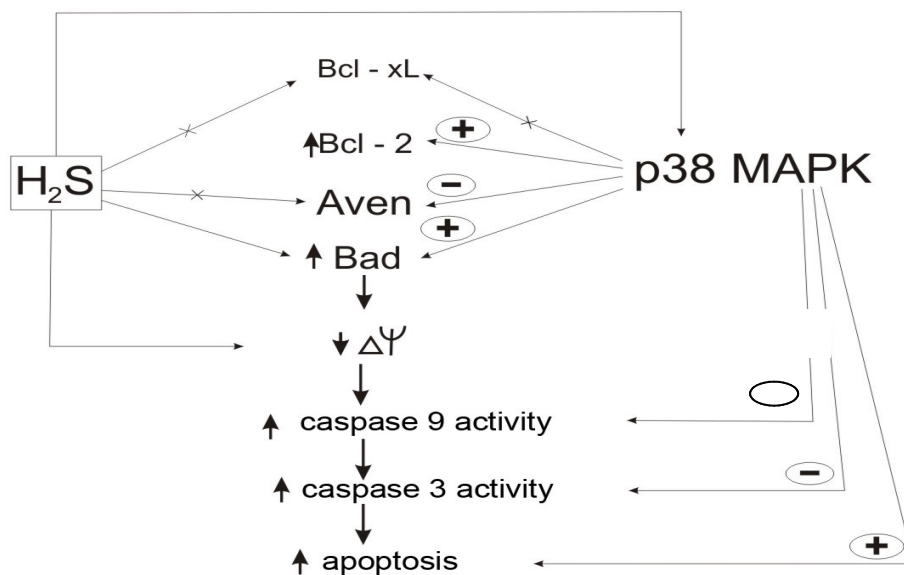


Рис.33 P38 MAPK-зависимые мишени проапоптотического действия донора сульфида водорода (по результатам собственных исследований) (+ - активирующее действие, - - ингибирующее действие)

Таким образом, p38 MAPK-зависимой мишенью действия 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.

Воздействие CORM-2 на фоне ингибированной p38 MAPK приводило к увеличению апоптоза клеток линии Jurkat, следовательно, в контексте повышения внутриклеточной концентрации монооксида углерода p38 MAPK обладает антиапоптотической функцией.

Величины активности каспаз 3 и 9 увеличивались при воздействии на клетки линии Jurkat ингибитора p38 MAPK и донора CO - до 3,65(3,59-3,70) и 3,25(3,23-3,29) усл.ед., соответственно, относительно соответствующих значений при изолированном действии газа [1,46(1,20-1,31) и 1,67(1,61-1,70) усл.ед., соответственно] ($p < 0,05$). Число клеток со сниженным

митохондриальным трансмембранным потенциалом также увеличивалось в случае сочетанного воздействия SB203580 и CORM-2 до 30,3(29,1-30,4)%, по сравнению с таковым в клетках, обработанных только донором СО [16,40(15,90-18,50)%] ($p < 0,05$) (табл.24). Следовательно, p38 MAPK являлась негативным регулятором активности каспаз 3 и 9 и стабилизировала мембраны митохондрий при повышении внутриклеточной концентрации монооксида углерода. При этом выключение p38 киназы приводило к возрастанию уровня Bcl-X_L, сниженного при изолированном действии СО.

Содержание белка Bcl-2 не изменялось при действии на клетки донора монооксида углерода, однако увеличивалось при ингибировании p38-зависимых путей действия данного газа. Таким образом, 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 СО. Данный протеин способен связываться с антиапоптотическими белками семейства Bcl-2, ингибировать их функцию, тем самым промотируя апоптоз. 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 повышении внутриклеточной концентрации монооксида углерода.

Таким образом, p38 MAPK-зависимыми мишенями действия СО в передаче сигнала к апоптозу являются белки Bcl-X_L и Bad (рис.34).

В случае воздействия оксида азота в высокой и низкой дозах на клетки линии Jurkat p38 MAPK обладала проапоптотическим действием. При этом не происходило изменений числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом в SNP+p38 MAPK-обработанной культуре, по сравнению с таковым в SNP-обработанных клетках [75,9(70,8-76,2) и 74,5(67,1-79,2)% , соответственно] ($p > 0,05$).

Число клеток с апоптотическими признаками, клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом, активность каспаз 3 и 9 в клетках линии Jurkat после ингибирования р38 MAPK-зависимых путей действия доноров газов, Me(Q1-Q3)

Условия эксперимента	Число клеток с апоптотическим и 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 100 мМ SNP	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 100 мМ SNP	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 10 мМ H ₂ S	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 H ₂ S	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 100 мкМ NOC-5	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	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 50 мкМ CORM-2	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	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

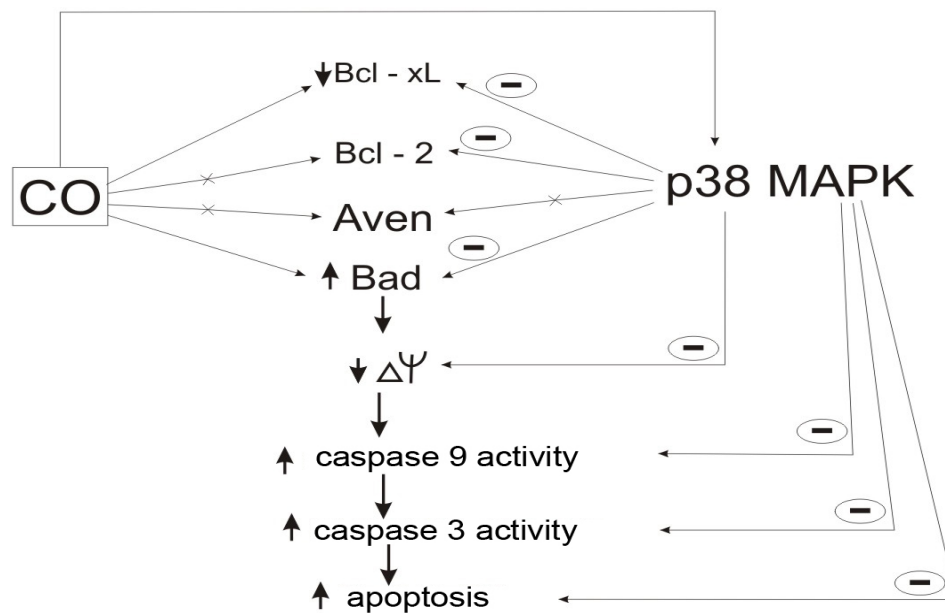


Рис.34 P38 MAPK-зависимые мишени проапоптотического действия донора монооксида углерода (по результатам собственных исследований) (+ - активирующее действие, - - ингибирующее действие)

Поскольку дисбаланс белков Bcl-2 способствует повышению проницаемости митохондриальных мембран, повышение содержания белков Bcl-2 и Bad при ингибировании p38-зависимых путей трансдукции сигнала с участием SNP не приводило к повышению числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом и, следовательно, не являлось причиной снижения апоптоза при ингибировании p38 MAPK. При этом воздействие SNP на фоне ингибированной p38 MAPK приводило к снижению активности каспаз 3 и 9 до 0,37(0,31-0,42) усл.ед. и 0,92(0,88-0,95) усл.ед., соответственно, по сравнению с изолированным воздействием SNP на клетки линии Jurkat [(2,17(2,04-2,19) и 3,09(3,06-3,11) усл.ед., соответственно] ($p < 0,05$). Снижение активности каспаз 3 и 9 при ингибировании p38 MAPK может быть результатом отсутствия негативного влияния данной киназы на содержание белков-ингибиторов каспаз. При этом 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 с ингибированной

p38 MAPK, по сравнению с таковыми с активной формой данной киназы в условиях воздействия на клетки SNP в концентрации 100 мМ.

P38 киназа стабилизировала мембраны митохондрий при действии на клетки NOC-5 в концентрации 100 мкМ. Об этом свидетельствовало увеличение числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом до 89,9(88,0-92,3)% в клетках, обработанных селективным ингибитором p38 MAPK и NOC-5, по сравнению с аналогичным параметром таковым после воздействия только NOC-5 в концентрации 100 мкМ [80,7(76,2-84,3)%, $p < 0,05$]. При этом ингибирование p38 MAPK приводило к повышению содержания антиапоптотического Bcl-2. Необходимо отметить, что повышение проницаемости митохондриальных мембран при воздействии на клетки линии Jurkat SB203580 и NOC-5 не приводило к активации каспаз 3 и 9, напротив, отмечалось угнетение активности данных ферментов. Так, уровень активности каспазы 3 составил 0,80(0,76-0,84) усл.ед., а каспазы 9 – 0,38(0,36-0,40) усл.ед. при ингибировании p38 MAPK-зависимых путей действия NO, что оказалось достоверно ниже соответствующих значений в культурах, подверженных воздействию только NOC-5 [1,62(1,57-1,66) и 0,96(0,91-1,01) усл.ед., соответственно] ($p < 0,05$). При этом отмечалось снижение уровня белков xIAP и Aven, способных к ингибированию активности каспаз 3 и 9. Можно предположить участие других членов семейства IAP в изменении активности изучаемых каспаз. Кроме того, известно, что оксид азота способен ингибировать каспазы за счет нитрозилирования. Возможно, фосфорилирование каспаз 3 и 9 за счет p38 MAPK предохраняло данные ферменты от нитрозилирующего ингибирования посредством NO (рис.35).

В целом, активность каспаз 3 и 9 и количество клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом отражали направленность апоптотической реакции при ингибировании p38 MAPK в случае NO и CO. Выключение p38 киназы при действии H_2S приводило к повышению активности каспазы 3 на фоне снижения числа клеток с

апоптотическими признаками. Данный факт нуждается в дальнейшей детализации.

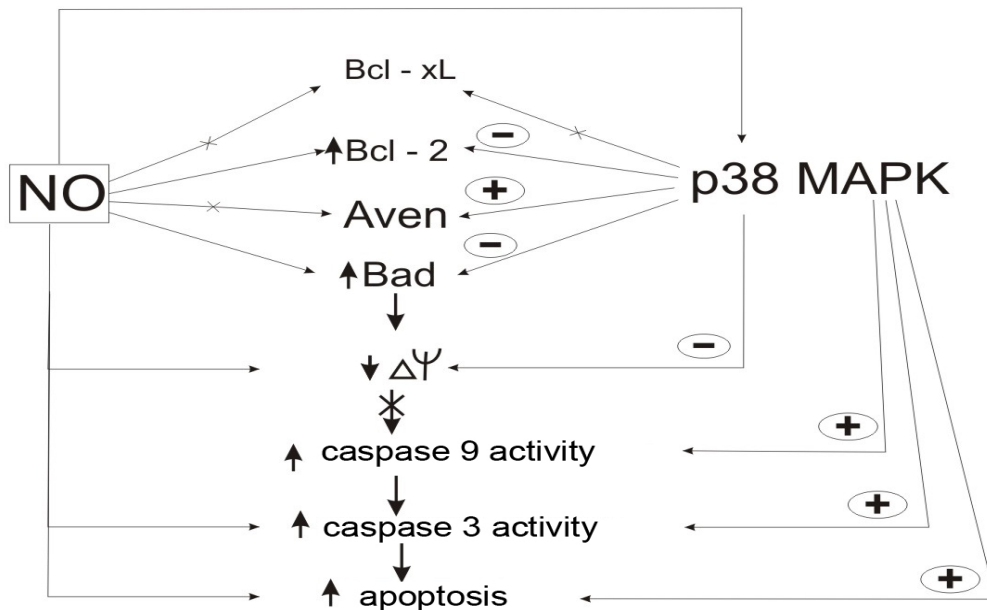


Рис.35 P38 MAPK-зависимые мишени проапоптотического действия донора оксида азота (по результатам собственных исследований) (+ - активирующее действие, - - ингибирующее действие)

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. Полученные результаты наводят на мысль, что данному белку не принадлежит роль ключевого регулятора апоптотической реакции в случае воздействия доноров газотрансмиттеров. Ингибирование p38 MAPK при действии сульфида водорода приводило к снижению уровня Bcl-2 и Bad. Следовательно, модифицируемые газами контекстные факторы могут по-разному модулировать молекулы, участвующие в регуляции апоптоза, после активации p38 MAPK. 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, р38 MAPK обладает проапоптотическим действием в случае увеличения внутриклеточной концентрации оксида азота и сульфида водорода, а также антиапоптотическим - в случае действия 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 донора 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 программированной 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 воздействия на различные регуляторные молекулы и механизмы. Так, оксид азота изменяет соотношение белков семейства Bcl-2 в пользу антиапоптотических представителей данной группы. При этом действие доноров NO (SNP и NOC-5) *in vitro* характеризуется резким падением митохондриального трансмембранного потенциала, что позволяет предполагать непосредственное влияние данного газа на белки и липиды митохондриальных мембран, приводящее к рассеиванию 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. Изменения содержания протеинов при действии оксида азота происходят за счет внутриклеточного накопления белков, независимого от уровня мРНК кодирующих их генов.

Донор монооксида углерода обладает проапоптотическим действием в отношении опухолевых клеток линии Jurkat. Просуицидальный эффект в случае CO достигается благодаря следующим событиям:

- 1) дисбалансу белков семейства Bcl-2 (снижение содержания антиапоптотических протеинов и повышение уровня проапоптотических членов данного семейства);
- 2) падению митохондриального трансмембранного потенциала;
- 3) активации каспазы 9;
- 4) активации каспазы 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 вазодилататорного 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 воздействия 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 высокой концентрации H₂S обусловлено неспецифическими механизмами. Об этом свидетельствует повышение содержания белков, промотирующих клеточный цикл без адекватной активации последнего. Остановка клеток в G₁-фазе при действии низкой концентрации сульфида водорода 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 (рис. 36-38). Молекулярные механизмы, опосредующие изменение соотношения белков-регуляторов, обусловлены посттранскрипционными модификациям в случае действия доноров газов. Дальнейшие исследования должны быть направлены на выявление роли данных механизмов при различных физиологических и патологических состояниях. Поскольку доноры газовых трансммиттеров обладают избирательным проапоптотическим и антипролиферативным действием в отношении опухолевых клеток, перспективным представляется апробация данных агентов в комплексной терапии онкологических заболеваний.

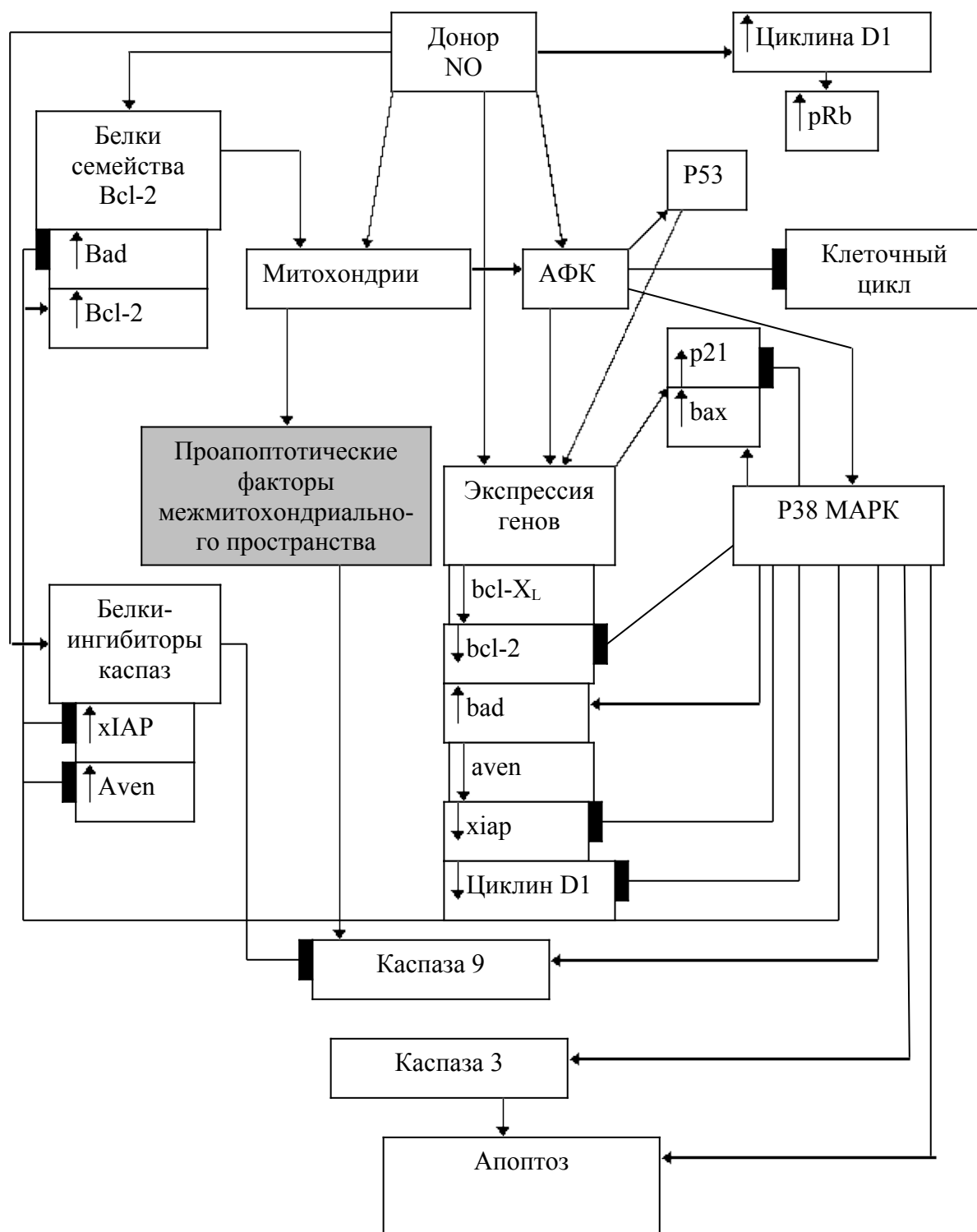


Рис.36 Молекулярные механизмы действия оксида азота в дизрегуляции апоптоза и клеточного цикла опухолевых клеток линии Jurkat (по данным S. Elmore (2007) (выделено цветом) и результатам собственных исследований)

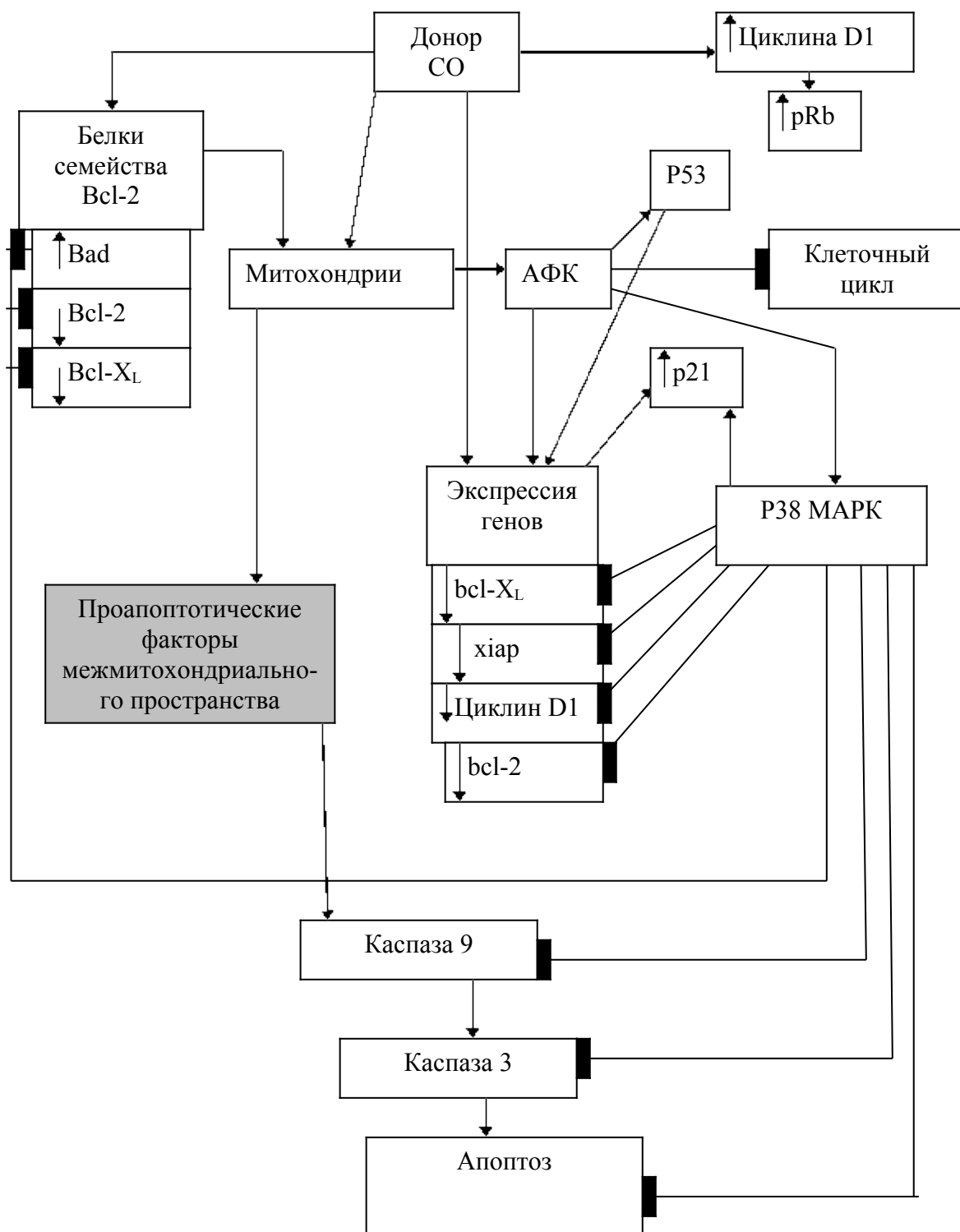


Рис.37 Молекулярные механизмы действия монооксида углерода в дисрегуляции апоптоза и клеточного цикла опухолевых клеток линии Jurkat (по данным S. Elmore (2007) (выделено цветом) и результатам собственных исследований)

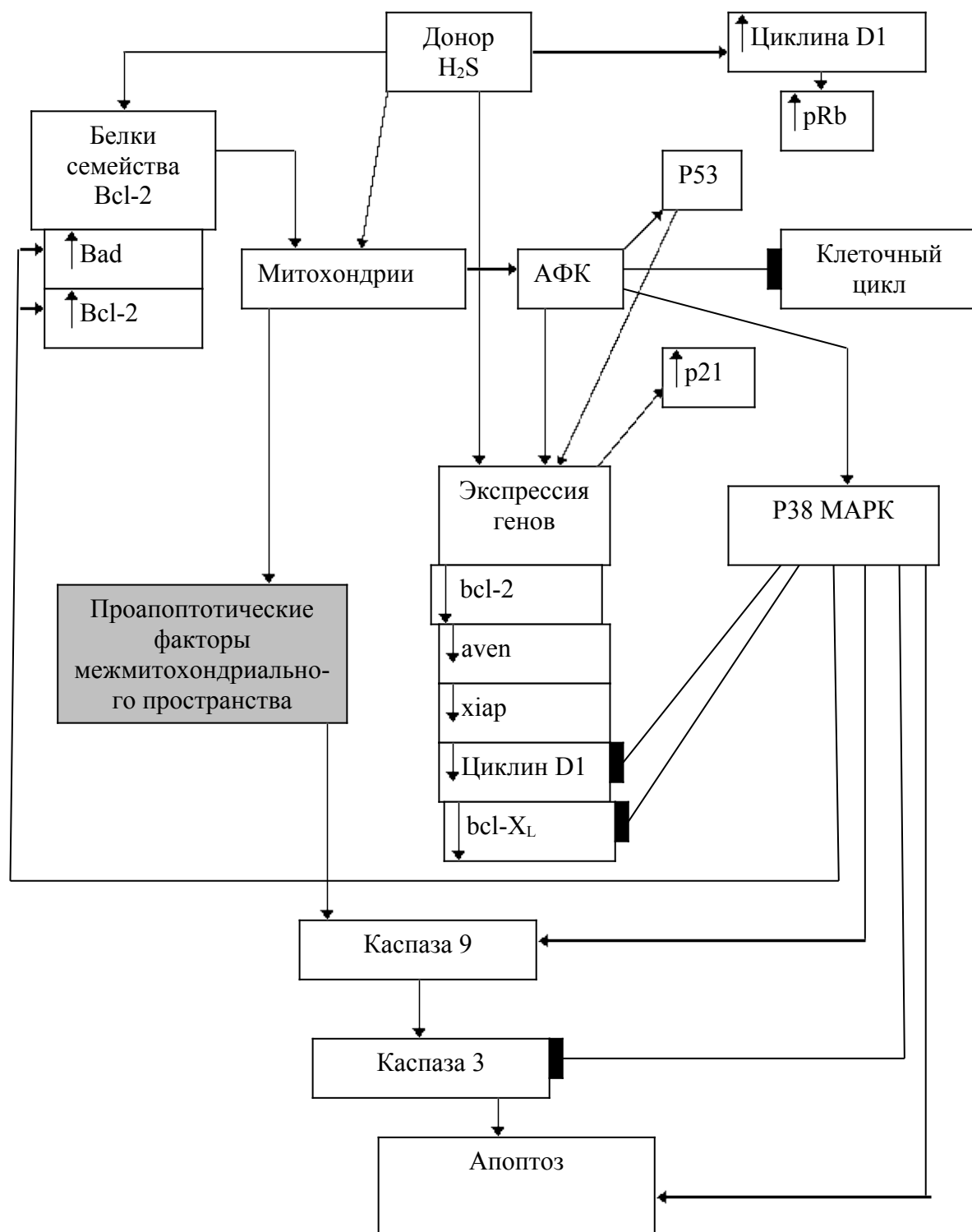


Рис.38 Молекулярные механизмы действия сульфида водорода в дизрегуляции апоптоза и клеточного цикла опухолевых клеток линии Jurkat (по данным S. Elmore (2007) (выделено цветом) и результатам собственных исследований).

Выводы

1. Инкубация клеток линии Jurkat с донорами газовых трансммиттеров (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 трансммиттеров (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 трансммиттеров 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 просуицидального 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 xIAP и Aven в клетках.
6. Увеличение числа клеток линии Jurkat в G₁-фазе клеточного цикла при действии доноров газовых трансммиттеров 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, xIAP, Aven, каспаза 3 и 9 при действии доноров оксида азота; Bad, Bcl-2, Bcl-X_L, xIAP, 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 mM NaHS, 50 мкМ CORM-2, 50 мкМ NaHS) регуляции клеточного цикла клеток линии Jurkat *in vitro*.

Список использованных сокращений

- АФК – активные формы кислорода
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДХФ-ДА – дихлорфлюоресцеиндиацетат
- ГАФДГ – глицерофосфат дегидрогеназа
- ГПО – глутатион-пероксидаза
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- ОС – окислительный стресс
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- СОД – супреоксиддисмутаза
- ФДЭ – фосфодиэстераза
- ФИТЦ – флюоресцеинизотиоцианат
- УФ-излучение – ультрафиолетовое излучение
- цАМФ – циклический аденозин-монофосфат
- цГМФ – циклический гуанозин-монофосфат
- AIF – apoptosis inducing factor; апоптоз-индуцирующий фактор
- ANT – adenil nucleotide translocator; транслокатор адениловых нуклеотидов
- Araf-1 – apoptosis proteases activating factor 1; фактор активирующий апоптотические протеазы 1
- ATM – ataksia teleangioectasia mutated; атаксия телеангиэктазия мутированный фактор
- ATR – ataksia teleangioectasia mutated and Rad3-associated factor; ATM и Rad3 – ассоциированный фактор
- Aven – caspase activation inhibitor; ингибитор активации каспаз
- CAK – Cdk activating kinase; Cdk активирующая киназа
- CAT – cysteine aminotranspherase; цистеин аминотрансфераза
- CBS – cestationin- β -syntase; цистатионин- β -синтаза
- CDC – cell division control; фактор, контролирующий клеточное деление
- Cdk – cyclin dependent kinase; циклин зависимая киназа

Cip/Kip – Cdk inhibiting protein/kinase inhibiting protein; Cdk-ингибирующий протеин/протеин, ингибирующий киназы

Chk – cell cycle check points kinase; киназа сверочных точек клеточного цикла

CKI – cycline-dependent kinases inhibitors; ингибиторы циклин-зависмых киназ

CORM – CO releasing molecule; CO высвобождающая молекула

CREB – cAMP response element-binding protein; протеин, связывающий цАМФ – зависимые элементы

CSE – cystationine- γ -lyase; цистатионин- γ -лиаза

DSBs – double strand brakes; разрывы двойной спиралиДНК

GPCRs – G-protein coupled receptors; G-протеин-связанные рецепторы

HIF1 – hypoxia inducible factor 1; гипоксия-индуцибельный фактор

HO – hemoxigenase; гемоксигеназа

I κ B – inhibitor of kappa B; ингибитор kappa B

IKK – I κ B-kinase; I κ B-киназа

INK4 – inhibitor of kinase 4; ингибитор киназы 4

IP3 – inositol -1,4,5-trephosphat; инозитол 1,4,5-трифосфат

JNK – c-Jun N-terminal kinases, c-Jun N-концевые киназы

LPS – lipopolysaccharides; липополисахариды

LSP – lymphocyte-specific protein; лимфоцит-специфический протеин

MAPK – mitogen-activated proteinkinase; митоген-активируемые протеинкиназа

МАРКАР – MAP kinase activated protein kinase; MAP-киназа акивированная протеинкиназа

MDM – p53-inducible E3-ubiquitin-lygase able to degradation; p53-индуцибельная E3-убиквитин-лигаза, способная к деградации

MLK – multilineage protein kinase; киназа смешанного происхождения

mTORC – mTOR protein complex, mTOR протеиновый комплекс

Myt 1 – myelin transcription factor 1; миелиновый транскрипционный фактор 1

NIK - NF-kB-inducing kinase; NF-kB-индуцирующая киназа

NO – nitric oxide; оксид азота

NOS – nitric oxide synthase; синтаза оксида азота

iNOS – inducible NO-synthase; индуцибельная NO-синтаза

nNOS – neuronal NO-synthase; нейрональная NO-синтаза

eNOS – endothelial NO-synthase; эндотелиальная NO-синтаза

PAC – p21-activated kinase; p21-активируемая киназа

PKG – cGMP-dependent –protein kinase; цГМФ-зависимая протеинкиназа

PSNA – proliferative cell nuclear antigen; ядерный антиген пролиферирующих клеток

PT-пора – pore of permeability transition; пора пермеабилizационного перехода

Rb – retinoblastoma protein; белок ретинобластомы

RTK – receptor of tirosine kinase; рецептор тирозинкиназы

sGC – soluble guanilate cyclase; растворимая гуанилатциклаза

sNOs – S-nitrothiols; S-нитротиолы

SAPK – stress activated protein kinase; стресс-активируемая протеинкиназа

SOD – superoxide dismutase; супероксиддисмутаза

TGF- β – transforming growth factor β ; трансформирующий фактор роста β

TNF α – tumor necrosis factor α ; фактор некроза опухоли α

TNFR I – receptor of tumor necrosis factor I type; рецептор фактора некроза опухоли I типа

VDAC – voltage dependent anionic channel; порин-вольтажзависимый канал

xIAP – x-inhibitor apoptosis protein; x-протеин, ингибирующий апоптоз

YY1 – Yin-Yiag1; Юн-Янг 1

3MST – 3-mercaptopyruvat sulfur transpherase; 3-меркаптопируват сульфур трансферазы

$\Delta\psi$ – митохондриальный трансмембранный потенциал

Список литературы

1. Активированные кислородные метаболиты в монооксигеназных реакциях / В.В. Ляхович, В.А.Вавилин, Н.К. Зенков и соавт. // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – Т. 118. - №4. – С.7-13.
2. Барсель, В.А. Состояние системы перекисного окисления липидов у больных ишемической болезнью сердца / В.А. Барсель, И.С. Шедрина, В.Д. Вахляев и соавт. // Кардиология. – 1998. - №5. – С.18-20.
3. Ванин, А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях / А.Ф. Ванин // Вестник РАМН. – 2000. – Т.4. - С. 3-5.
4. Голиков, П.П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний / П.П. Голиков. - М.: ИД Медпрактика-М. – 2004. - 180 с
5. Дубинина, Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса / Е.Е. Дубинина // Вопросы медицинской химии.- 2001. - Т.47, №6.- С. 561-581
6. Залетаев, Д.В. Горбунова В.Н., Бабенко О.В. Онкогеномика и молекулярная диагностика в онкологии / Д.В. Залетаев, В.Н. Горбунова, О.В. Бабенко; под редакцией В.И. Иванова, А.Л. Киселева - Геномика – медицине -М.: ИКЦ «Академкнига», 2005– 390с.
7. Зенков, Н.К., Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. - М.: МАИК «Наука/Интерпериодика». - 2001. - 343 с.
8. Коржов, В.И. Монооксид углерода / В.И. Коржов, А.В. Видмаченко, М.В. Коржов // Журн. АМН Украины. - 2010. – Том.16. - №1. – С. 23-37.
9. Кремер Н.Ш. Теория вероятностей и математическая статистика. 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Юнити-Дана, 2004. — 573 с.
10. Ланкин, В.З. Антиоксиданты и атеросклероз: Критический анализ проблемы и направление дальнейших исследований / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, А.И. Каминный // Патогенез, – 2004 - №1. – С. 71-86

11. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика / под ред. Дж. Натвиг и др. – М.: Медицина, 1980. – 280 с.
12. Львова, О.А. К вопросу о роли оксида азота в норме и при патологии нервной системы / Львова, О.А. Орлова А.Е., Гусев В.В. // Системная интеграция в здравоохранении. - 2010. - №4. – С.20-35.
13. Марков, Х.М. Роль оксида азота в патогенезе болезней детского возраста / Х.М. Марков // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2000. - №4. – С.43-47.
14. Осипов, А.Н. 2007. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов / А.Н. Осипов // Успехи биологической химии.- №47. – С.259-292.
15. Регистрация блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови как экспресс-метод оценки тяжести состояния больных осложненными формами гипертонической болезни / Инжутова А.И., Салмина А.Б., Петрова М.М. и соавт. // Бюллетень СО РАМН. – 2007. - Т.123. - №1. – С.6-10.
16. Регуляторная роль оксида азота в апоптозе нейтрофилов / Е.А. Степовая, Т.В. Жаворонок, Ю.В. Стариков и соавт. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2008. – Том.146. - №12. – С. 646-650.
17. Резник, Н.Л. Третий газ: сульфид водорода как нейротрансмиттер / Н.Л. Резник // Химия и Жизнь. – 2009. - №10. – С. 24-29.
18. Реутов, В.П. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности / В.П. Реутов // Биохимия. - 2002. – Том.67.№3. – С. 353–376.
19. Северина, И.С. Оксид азота. Роль растворимой гуанилатциклазы в механизмах его физиологических эффектов / И.С. Северина // Вопросы медицинской химии. - 2002. - вып 1. - С.4-30.
20. Терещенко, С.Н. Полиморфизм генов ангиотензин-превращающего фермента, ангиотензина II, NO-синтазы, эстрогеновых

рецепторов и гендерные различия в их влиянии на развитие сердечнососудистой патологии / С.Н. Терещенко, Д.А.Затейщиков, И.В. Жиров // Кардиология. – 2009. - №4. – С.22-26.

21. Шемарова, И.В. Роль протеинкиназных каскадов в передаче стрессовых сигналов в клетках низших эукариот/ И.В. Шемарова // Цитология. – 2006. –Т. 48, №2. – С.95-113.

22. A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast / E.V. Pavlov, M. Priault, D.Pietkiewicz et al // J Cell Biol. - 2001. – Vol.155. – P.725–732

23. A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited / Uhlmann F., Bouchoux C., López-Avilés S. A // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2011. – Vol.356. - №1584. – P.3572-3583

24. A sting in the tail: ubiquitin ligase function of inhibitor of apoptosis proteins / Mace P., Shirley S., Day C. // Austr. Biochemist. - 2009. - Vol.40. - №1. – P.12-15.

25. A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis / M. Kracikova, G. Akiri, A. George et al.// Cell Death Differ. – 2013. – Vol. 4. – P.576-588.

26. Aberg, A.M. Carbon monoxide in biological systems: an experimental and clinical study / Aberg A.M. // Acta Anaesthesiol. Scand. – 2008. – Vol.52. – P. 716–717.

27. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes / X. Liu, M. J. S. Miller, M. S. Joshi // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. - Vol. 95. – P. 2175–2179.

28. Activation of p38 MAP kinase by DNA double-strand breaks in V(D)J recombination induces a G2/M cell cycle checkpoint / G. Pedraza-Alva, M. Koulunis, C. Charland et al. // EMBO J. - 2006. – Vol.25.№4. – P.763-773.

29. Adams, JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis / J.M. Adams// Genes Dev. – 2003. – Vol.17.№20. – P.2481-95.

30. Adenovirus-mediated transfer and overexpression of heme oxygenase

1 cDNA in lung prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis via a Fas-Fas ligand-independent pathway / T. Tsuburai, M. Suzuki, Y. Nagashima et al. // *Hum Gene Ther.* - 2002. – Vol.13. – P.1945 – 1960.

31. Alam, J. Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway / J. Alam, J.L.Cook // *Curr Pharm Des.* – 2003. – Vol.9. №30. – P.2499-2511.

32. Aleem, E. Cdc2-Cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition / Aleem E., Kiokawa H., Kaldis Ph. // *Nature Cell Biol.* – 2005. - Vol.7. – P.831–836.

33. Al-Sadoni, H.H. S-Nitrosothiols as Nitric Oxide-Donors: chemistry, biology and possible future therapeutic applications / H.H. Al-Sadoni, A. Ferro // *Curr. Med. Chem.* – 2004. – Vol.11. – P.2679-2690.

34. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays / R. Zhao , K. Gish , M. Murphy et al. // *Genes Dev.* – 2000. – Vol.8. – P.981-993.

35. Antiapoptotic role of p38 mitogen activated protein kinase in Jurkat T cells and normal human T lymphocytes treated with 8-methoxypsoralen and ultraviolet-A radiation / A. Cappellini, P.L. Tazzari, I. Mantovani et al. // *Apoptosis.* - 2005. – Vol.1. – P.141-152.

36. Apoptosis-inducing factor and apoptosis / C.X. Lü, T.J. Fan, G.B. Hu, R.S. Cong // *Acta Biochim Biophys Sin.* – 2003. – Vol.35. – P.881–885.

37. Apoptosis-inhibiting activities of BIR family proteins in *Xenopus* egg extracts / Y. Tsuchiya, S. Murai, S. Yamashita // *FEBS J.* – 2005. – Vol. 272. – P. 2237-2250.

38. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1 / B. N. Chau, E. H. Cheng, D. A. Kerr, J. M. Hardwick // *Mol. Cell.* – 2000. – Vol. 6. – P. 31-40.

39. Bach, F.H. Heme oxygenase-1 as a protective gene / F.H. Bach // *Wien Klin Wochenschr.* – 2002. – Vol.114. – P.1-3.

40. Baskar, R. Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in

apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells / R. Baskar, L. Li, P.K. Moore // *FASEB J.* – 2007. – Vol.21.№1. – P.247-255.

41. Basker, R. Hydrogen sulfide gas has cell growth regulatory role / R. Basker, J. Bian // *Eur J Pharmacol.* – 2011. – Vol. 656. – P. 5–9.

42. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis / A. Nechushtan, C.L. Smith, I. Lamensdorf et al. // *J Cell Biol.* – 2001. – Vol.153. – P.1265–1276.

43. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator / C. Brenner, H. Cadiou, H.L.Vieira et al. // *Oncogene.* - 2000.– Vol.19.– P.329–336.

44. Beere, H.M. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways / H.M. Beere // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2005. – Vol. 115, № 10. – P.695-698.

45. Bellamy, T.C. On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide / T.C. Bellamy, J. Wood, J. Garthwaite // *Proc Natl Acad Sci U S A.*- 2002.- V. 99.- P. 507–510.

46. Bench-to-bedside review: Hydrogen sulfide--the third gaseous transmitter: applications for critical care / F. Wagner, P. Asfar, E. Calzia et al. // *Crit Care.* – 2009. – Vol.13. – p.213-215.

47. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis / A. Shamas-Din, H. Brahmabhatt, B. Leber, D.W. Andrews // *Biochim Biophys Acta.* 2011

48. Bhatia, M. Hydrogen sulfide as vasodilator / M. Bhatia // *Life.* – 2005.- Vol.57. – P. 603-606.

49. Breast cancer cells with inhibition of p38alpha have decreased MMP-9 activity and exhibit decreased bone metastasis in mice / C. Suarez-Cuervo, M.A. Merrell, L. Watson et al. // *Clin Exp Metastasis.* – 2004. – Vol.21.№6. – P.525-33.

50. Bredt, D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology / D.S. Bredt // *Free Radic Res* 1999. – Vol. 31. - P. 577–596.

51. Buerk, D.G. Nitric oxide regulation of microvascular oxygen / D.G. Buerk // *Antioxid Redox Signal.* – 2007. - № 9. – P. 829–843.

52. Butte, A.J. Further defining housekeeping, or “maintenance”, genes focus on a compendium of gene expression in normal human tissues / A.J. Butte // *Physiol. Genomics*. – 2001. – Vol.7.№2. – P.95-96.

53. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria / B.M. Polster, G. Basañez, A. Etxebarria et al. // *J Biol Chem*. – 2005. – Vol.280. – P.6447-6454.

54. Calvert, J.W. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling / J. W. Calvert, S. Jha, S. Gundewar // *Circ Res*. – 2009. – Vol. 105. – P. 365–374.

55. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis / S. Brouard, L.E. Otterbein, J. Anrather et al. // *J Exp Med*. – 2000. – Vol.192. - №7. – P.1015-1026.

56. Carbon monoxide prevents hepatic mitochondrial membrane permeabilization / C.S. Queiroga, A.S. Almeida, P.M Alves et al. // *BMC Cell Biology*. - 2011. – Vol.12. – P.1-8.

57. Carbon monoxide protects against cardiac ischemia--reperfusion injury in vivo via MAPK and Akt--eNOS pathways / H. Fujimoto, M. Ohno, S. Ayabe, H. Kobayashi et al. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2004. - Vol.24.№10. – P.1848-1853.

58. Carbon monoxide releasing molecule-2 attenuated ischemia/reperfusion-induced apoptosis in cardiomyocytes via a mitochondrial pathway / S. Zhao, Q. Lin, H. Li et al. // *Mol Med Rep*. – 2014. – Vol.9. №2. – P.754-762.

59. Carbon monoxide rescues ischemic lungs by interrupting MAPK driven expression of early growth response 1 gene and its downstream target genes / S. Mishra, T. Fujita, N.V. Lama et al.// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – Vol.103. – P.5191–5196.

60. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages / P. Sawle, R. Foresti, B.E. Mann et al. // *Br. J. Pharmacol*. – 2005. –

Vol.145. – P. 800–810.

61. Carbon monoxide-sensitive apoptotic death of erythrocytes / E. Lang, S.M. Qadri, K. Jilani et al. // Basic Clin Pharmacol Toxicol. – 2012. – Vol.111. №5. – P.348-55.

62. Caspase-8 and apaf-1-independent caspase-9 activation in Sendai virus-infected cells / M. Bitzer, S. Armeanu, F. Prinz et al. // J Biol Chem. – 2002. – Vol.277. – P.29817–29824.

63. CDC25 phosphatase inhibitors: an update / Lavecchia A., Giovanni C.D., Novellino E. // Mini Rev Med Chem. – 2012. – Vol.12. – P.62-73.

64. Cell damage following carbon monoxide releasing molecule exposure: implications for therapeutic applications / I.C. Winburn, K. Gunatunga, R.D. McKernan, R.J. Walker et al. // Basic Clin Pharmacol Toxicol. – 2012. – Vol.111.№1. – P.31-41.

65. Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis / P. Inguaggiato, L. Gonzalez- Michaca, A.J. Croatt et al. // Kidney Int. - 2001. Vol.60. – P. 2181 – 2191.

66. Cerecetto, H. Pharmacological properties of furoxans and benzofuroxans: recent developments / H. Cerecetto, W. Porcal // Mini-Rev. Med. Chem. –2005 - Vol.5. – P.57-71.

67. Chronic hypoxia-enhanced murine pulmonary vasoconstriction: role of superoxide and gp91phox / Liu J.Q., Erbynn E.M., Folz R.J. // Chest. – 2005. – Vol.128. – P.594-596.

68. Colitti, M. BCL-2 family of proteins and mammary cellular fate / M. Colitti // Anat Histol Embryol. – 2012. – Vol.41.№4. – P.237-247.

69. Constitutive activation of the MAPkinase p38 is critical for MMP-9 production and survival of B-CLL cells on bone marrow stromal cells / I. Ringshausen, T. Dechow, F. Schneller et al. // Leukemia. – 2004. - Vol.18. – P.1964-1968.

70. Coqueret, O. Linking cyclins to transcriptional control / O. Coqueret // Gene. – 2002. – Vol.299. – P.35-55.

71. Cowling, V. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: Absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain / V. Cowling, J. Downward // *Cell Death Differ.* – 2002. – Vol.9. – P.1046–1056.

72. Crystal structure of the retinoblastoma tumor suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation / B. Xiao, J. Spencer, A. Clements, N. Ali-Khan et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol.100. – P.2363–2368

73. Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis / M.W. Landis, B.S. Pawlyk, T. Li et al. // *Cancer Cell.* – 2006. - Vol9. – P.13–22.

74. Cyclin D2 is a FSHresponsive gene involve gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis / P. Sicinski, J.L. Donaher, Y. Geng // *Nature.* – 1996. – Vol.384. – P.470–471.

75. Cystathionine beta-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse / Y. Enokido, E. Suzuki, K. Iwasawa et al. // *CNS.FASEB J.* – 2005. – Vol. 19. – P. 1854–1856.

76. Cystathionine c-lyase-deficient mice require dietary cysteine to protect against acute lethal myopathy and oxidative injury / I. Ishii, N. Akahoshi, H. Yamada et al. // *J Biol Chem.* – 2010. - Vol. 285. – P.26358–26368.

77. Dai, Y. New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network / Y. Dai, S. Grant // *Clin Cancer Res.* – 2010. – Vol.16. – P.376-383.

78. Dazard, J.E. Genome-wide comparison of human keratinocyte and squamous cell carcinoma responses to UVB irradiation: implications for skin and epithelial cancer / J.E. Dazard, H. Gal, N. Amariglio et al. // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22. – P. 2993-3006.

79. De Clercq, A. Cyclin-dependent kinase inhibitors in yeast, animals, and plants: a functional comparison / De Clercq A., Inzé D.Crit. // *Biochem Mol*

Biol. – 2006. – Vol.41. – P.293-313.

80. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid / J. H. Suh, S. V. Shenvi, B. M. Dixon // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2004. – Vol. 101. – P. 3381–3386.

81. Derbyshire, E.R. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase / E.R. Derbyshire, M.A. Marletta // *Annu. Rev. Biochem.* –2012. - Vol.81. – P.533-559.

82. Development of mice expressing a single D-type cyclin / M. Ciemerych, A.M. Kenney, E. Sicinska // *Genes Dev.* – 2002. –Vol.16. –P.3277–3289.

83. Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor / M. Loeffler, E. Daugas, S.A. Susin et al. // *FASEB J.* – 2001. – Vol.15. – P.758-767.

84. E2F is required to prevent inappropriate S-phase entry of mammalian cells / S. He, B.L. Cook, B.E. Deverman et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – Vol.20. – P.363–371.

85. Effect of nitroxyl on the hamster retinal nitridergic pathway / D. A. Saenz, S. E. Bari, E. Salido // *Neurochem Int.* - 2007. – Vol. 51. – P. 424–432.

86. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death / Elmore S. // *Toxicologic Pathology.* – 2007. – Vol. 35. – P. 495 – 516.

87. Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning / Q. C. Yong, S. W. Lee, C. S. Foo et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2008. – Vol. 295. – P. H1330–H1340.

88. Endogenous methylarginines modulate superoxide as well as nitric oxide generation from neuronal nitric-oxide synthase: differences in the effects of onomethyland dimethylarginines in the presence and absence of tetrahydrobiopterin / A. J. Cardounel, Y. Xia, J. L. Zweier // *J Biol Chem.* - 2005. – Vol. 280. – P. 7540–7549.

89. Engin, A.B. Dual Function of Nitric Oxide in Carcinogenesis, Reappraisal / A. B. Engin // *Current Drug Metabolism.* – 2011. – Vol.102. –

P.8758–8763

90. Evan, G.I. Proliferation, cell cycle and apoptosis / G.I. Evan, K.H. Vousden // *Nature*. - 2001. - Vol. 411. - P. 342 —348.

91. Ex vivo application of carbon monoxide in University of Wisconsin solution to prevent intestinal cold ischemia/reperfusion injury / A. Nakao, H. Toyokawa, A. Tsung // *Am J Transplant*. – 2006. - № 6. – P. 2243–2255.

92. Fang, J. In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor / Fang J., Sawa T., Akaike T. // *J Cancer Res*. - 2003. – Vol.63. – P.3567 -3574.

93. Focus on recent approaches for the development of new NO-donors / A. Gasco, R. Fruttero, B. Rolando // *Mini-Rev. Med. Chem*. – 2005. – Vol.5. – P.217-229.

94. Foresti, R. Interaction of carbon monoxide with transition metals: evolutionary insights into drug target discovery / R. Foresti, R. Motterlini // *Curr. Drug Targets*. – 2010. – Vol.11. – P.1595–1604.

95. Fu, Y.F. Bcl-2 family proteins and apoptosis / Fu Y.F., Fan T.J. // *Acta Biochim Biophys Sin*. – 2002. – Vol.34. – P.389–394.

96. Gallo, K.A. Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways / K.A. Gallo, G.L. Johnson // *Nature Reviews Molecular cell Biology*. – 2002. – Vol.3, № 9. – P.663-672.

97. Garbán, H.J. Nitric oxide sensitizes ovarian tumor cells to Fas-induced apoptosis / H.J. Garbán, B. Bonavida // *Gynecol Oncol*. - 1999 . – Vol.73. – P.257-264.

98. García-Sáez, A.J. The secrets of the Bcl-2 family / A.J. García-Sáez // *Cell Death Differ*. - 2012. – Vol.19.№11. – P.1733-1740.

99. Garte, A.L. p21(WAF1/CIP1) and cancer: a shifting paradigm? / A.L. Garte // *Biofactors*. – 2009. – Vol.35. – P.161-164.

100. Garthwaite, J. New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications / J. Garthwaite // *Mol Cell Biochem*. – 2010. – Vol.334. – P.221-232. doi:

10.1007/s11010-009-0318-8.

101. Garvalov, B.K. Cancer stem cells: a new framework for the design of tumor therapies / B.K. Garvalov, T. Acker // *J. Mol. Med.* – 2011. – Vol.89. – P.95–107.

102. Gasotransmitters in the gastrointestinal tract / M.S. Kasperek, D.R. Linden, M.E. Kreis, M.G. Sarr // *Surgery.* – 2008. - Vol.143. - №4. –P.455-459. doi: 10.1016/j.surg.2007.10.017.

103. Ghosh, D.K. Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control / D.K. Ghosh, J.C. Salerno // *Front Biosci.* – 2003. - № 8. – P. d193–d209.

104. Giacinti, C. RB and cell cycle progression / C. Giacinti, A. Giordano // *Oncogene.* – 2006. - Vol.25. – P.5220–5227

105. Green, D.R. The pathophysiology of mitochondrial cell death / D.R. Green., G. Kroemer // *Science.* - 2004. – Vol. 305. – P.626-629.

106. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP / K.A. Lucas, G.M. Pitari, S. Kazerounian, I. Ruiz-Stewart // *Pharmacol Rev.* – 2000. –Vol.52.№3. – P.375-414.

107. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat / L. Li, M. Salto-Tellez, C. H. Tan et al. // *Free Radic Biol Med.* - 2009. – Vol. 47. – P. 103–113.

108. H₂S as a physiologic vasorelaxant: Hypertension in mice with deletion of cystathionine c-lyase / G. Yang, L. Wu, B. Jiang et al. // *Science.* – 2008. – Vol. 322. – P. 587–590.

109. H₂S biogenesis by human cystathionine clyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia / T. Chiku, D. Padovani, W. Zhu // *J Biol Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 11601–11612.

110. Hajra, K.M. Apoptosome dysfunction in human cancer / K.M. Hajra, J.R. Liu // *Apoptosis.* – 2004. – Vol.9. – P.691–704

111. Hapoo, L. BH3-only proteins in apoptosis at a glance / L. Hapoo, A.

Strasser, S. Cory // J Cell Sci. – 2012. – Vol.125. – P.1081-1087.

112. Harper J.W. Cyclin dependent kinase inhibitors / Harper J.W. // Cancer Surv. – 1997. – Vol.29. – P.91-107.

113. Hartman, M.L. Pro-apoptotic activity of BH3-only proteins and BH3 mimetics: from theory to potential cancer therapy / M.L. Hartman, M. Czyz // Anticancer Agents Med Chem. – 2012. – Vol.12.№8. – P.966-981.

114. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation / A. Freitas, J.C. Alves-Filho, D.D. Secco et al. // Br. J. Pharmacol. – 2006. – Vol.149. – P.345–354.

115. Heme Oxygenase-1 in Tumor Biology and Therapy / H. Was, J. Dulak, A. Jozkowicz // Current Drug Targets. – 2010. – Vol.11. – P.1551-1570

116. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress / Q. Lin, S. Weis, G. Yang // J Biol Chem. – 2007. – Vol. 282. – P.20621-20633.

117. Huycke, M.M. Commensal Bacteria, Redox Stress, and Colorectal Cancer: Mechanisms and Models / M.M. Huycke, H.R. Gaskins // Exp Biol Med. – 2004. – Vol.229. – P. 586-597

118. Hydrogen sulfide and cell signaling / L. Li, P. Rose, P. K. Moore // Annu Rev Pharmacol Toxicol. – 2011. – Vol. 51. – P. 169–187.

119. Hydrogen sulfide attenuated tumor necrosis factor-alpha-induced inflammatory signaling and dysfunction in vascular endothelial cells / L. L. Pan, X. H. Liu, Q. H. Gong et al. // PLoS. – 2011. - One 6. – P. e19766.

120. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function / J. W. Elrod, J. W. Calvert, J. Morrison et al. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2007. – Vol. 104. – P. 15560–15565.

121. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria / Y. Kimura, Y-I Goto, H. Kimura // Antioxid Redox Signal. – 2010. - № 12. – P. 1–13.

122. Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF-kB pathway / L. Zhi, A.D.

Ang, H. Zhang et al. // J.of Leukocyte Biology. – 2007. - Vol.81. – P.1322-1332.

123. Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3 / L. Rinaldi, G. Gobbi, M. Pambianco et al. // Lab Invest. – 2006. – Vol.86.№4. – P.391-397.

124. Hydrogen sulfide prevents ethanolinduced gastric damage in mice: Role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons / J. V. Medeiros, V. H. Bezerra, A. S. Gomes et al. // J Pharmacol Exp Ther. – 2009. – Vol. 330. – P. 764–770.

125. Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress / Y. Kimura, R. Dargusch, D. Schubert et al. // Antioxid Redox Signal. – 2006. - № 8. – P. 661–670.

126. Hydrogen sulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of Ca²⁺ influx / Y. Mikami, N. Shibuya, Y. Kimura et al. // J Biol Chem. – 2011. – Vol. 286. – P. 39379–39386.

127. Hydrogen sulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of Ca²⁺ influx / Y. Mikami, N. Shibuya, Y. Kimura // J Biol Chem. – 2011. – Vol. 286. – P. 39379–39386.

128. Hydrogen sulfide contributes to cardioprotection during ischemia-reperfusion injury by opening K ATP channels / Z. Zhang, H. Huang, P. Liu et al. // Can J Physiol Pharmacol. – 2007. – Vol.85. – P.1248-1253.

129. Hydrogen sulfide inhibits high glucose-induced matrix protein synthesis by activating AMP-activated protein kinase in renal epithelial cells / H.J. Lee, M.M. Mariappan, D. Feliers et al. // J Biol Chem. – 2012. – Vol.287.№7. - 4451-4461.

130. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? / P.K. Moore, M. Bhatia, S.Moochhala // Trends Pharmacol Sci. – 2003. – Vol.24.№12. – P.609-11.

131. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of MAP kinases and caspase-3 / G. Yang, X. Sun, R. Wang // FASEB J. – 2004. – Vol.18. – P.1782 – 1784.

132. Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs inhibit the growth of human cancer cells: A general property and evidence of a tissue type independent effect / M. Chattopadhyay, R. Kodela, N. Nath et al. // *Biochem Pharmacol* . – 2012. – Vol. 83. – P. 715–722.

133. Hydrogen sulphide: A novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? / M. Whiteman, N. S. Cheung, Y. Z. Zhu et al. // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2005. – Vol. 326. – P. 794–798.

134. Hypoxic inducible factor 1 alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide / D.D. Thomas, M.G. Espey, L.A. Ridnour // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2004. – Vol.101. – P. 8894–8899.

135. Hypoxic pulmonary vasodilation: A paradigm shift with a hydrogen sulfide mechanism / K. R. Olson, N. L. Whitfield, S. E. Bearden // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. – 2010. – Vol. 298. – P. R51–R60.

136. IAPs are functionally non-equivalent and regulate effector caspases through distinct mechanisms / T. Tenev, A. Zachariou, R. Wilson et al. // *NCB*. – 2005. – Vol. 7. – P. 70-77

137. Ichinohe, A. Cystathionine beta-synthase is enriched in the brains of Down's patients / A. Ichinohe, T. Kanaumi, S. Takashima et al. // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2005. – Vol. 338. – P. 1547–1550.

138. Induction of apoptosis by nitric oxide in macrophages is independent of apoptotic volume decrease / S. Hortelano, M. Zeini, A. Castrillo // *Cell Death Differ*. - 2002. – Vol.9. – P.643-650.

139. Inhale to survive, cycle or die? / B. Wegiel, B.Y. Chin, L.E. Otterbein // *Cell Cycle*. – 2008. – Vol.7. – P.1379-1384.

140. Inhaled carbon monoxide suppresses the development of postoperative ileus in the murine small intestine / B. A. Moore, L. E. Otterbein, A. Turler et al. // *Gastroenterology*. – 2003. – Vol. 124. – P. 377–391. 8. – P. d193–d209.

141. Inhibitor of apoptosis (IAP)-like protein lacks a baculovirus IAP repeat (BIR) domain and attenuates cell death in plant and animal

systems / W.Y. Kim, S.Y. Lee, Y.J. Jung, H.B. Chae, G.M. Nawkar, M.R. Shin, S.Y. Kim // J Biol Chem. – 2011. – Vol.286.№49. – P.42670-42678.

142. Inhibitors of p38 and ERK1/2 MAPkinase and hydrogen sulphide block constitutive and IL-1 β -induced IL-6 and IL-8 expression in the human chondrocyte cell line C-28/I2 / B. Kloesch, M. Liszt, G. Steiner et al. // Rheumatol Int. – 2012. – Vol. 32. – P. 729–736.

143. Inoue, D. The Polo-like kinase Plx1 interacts with and inhibits Myt1 after fertilization of *Xenopus* eggs / D. Inoue, N. Sagata // EMBO J. - 2005. – Vol.24. – P.1057 -1067.

144. Interactions of Multiple Gas-Transducing Systems: Hallmarks and Uncertainties of CO, NO and H₂S Gas Biology / M. Kajimura, R. Fukuda, R.M. Bateman, T. Yamamoto, M. Suematsu // Antioxid. Redox Signal. -2010. – Vol.13. – P.157-193.

145. Involvement of caspase-2 and caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: a role for the IAPs / H.H. Cheung, N. Lynn Kelly, P. Liston, R.G. Korneluk // Exp Cell Res. – 2006. – Vol.312.№12. – P.2347-2357.

146. Ionizing radiation activates IGF-1R triggering a cytoprotective signaling by interfering with Ku-DNA binding and by modulating Ku86 expression via a p38 kinase-dependent mechanism / D. Cosaceanu, R.A. Budiu, M. Carapancea et al. // Oncogene. - 2007. – Vol. 26.№17. – P.2423-2434.

147. Jacob, C. Perspective on recent developments on sulfur-containing agents and hydrogen sulfide signaling / C. Jacob, A. Anwar, T. Burkholz // Planta Med. – 2008.- Vol. 74. – P. 1580–1592.

148. Jeon, H.K. Association of the ERK1/2 and p38 kinase pathways with nitric oxide-induced apoptosis and cell cycle arrest in colon cancer cells / H.K. Jeon, S.U. Choi, N.P. Jung // Cell Biol Toxicol. – 2005. – Vol.21.№2Ю – P.115-125.

149. Jiang, X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to apaf-1 / X. Jiang, X. Wang // J Biol Chem. – 2000. – Vol.275. – P.311998–311203.

150. JNK1-dependent antimitotic activity of thiazolidin compounds in human non-small-cell lung and colon cancer cells / F. Teraishi, S. Wu, J. Sasaki, L. Zhang // CMLS Cellular and Molecular Life Sciences. – 2005. – Vol. 62. – P.2382-2389
151. John, P.C. Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division / John P.C., Mews M., Moore R. // Protoplasma. – 2001. – Vol.216. – P.119-142.
152. Johnson, C.R. Caspase-9 regulation: An update / Johnson C.R., Jarvis W.D. // Apoptosis. – 2004. – Vol.9. – P. 423–427.
153. Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress / D. P. Jones // Am J Physiol Cell Physiol. – 2008. – Vol. 295. – P. C 849–868.
154. Jozkowicz, A. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? / A. Jozkowicz, H. Was, J. Dulak // Antioxid Redox Signal. - 2007. – Vol.12. -2099-2117.
155. Kabil, O. Redox biochemistry of hydrogen sulfide / O. Kabil, R. Banerjee // J Biol Chem. – 2010. – Vol. 285. – P. 21903–21907.
156. Kashfi, K. Biology and therapeutic potential of hydrogen sulfide and hydrogen sulfide-releasing chimeras / K. Kashfi, K.R. Olson // Biochem Pharmacol. – 2013. – Vol.85.№5. – P.689-703.
157. Kasten, M. Cell cycle checkpoints and cancer / M. Kasten, J. Bartek // Nature. – 2004. – Vol.432. – P.316-323.
158. Kilbride, S.M. Central roles of apoptotic proteins in mitochondrial function / Kilbride S.M., Prehn J.H. // Oncogene. – 2012. – Vol.7. – P.34-42.
159. Kim, Y.T. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma / Y.T. Kim, M. Zhao // Yonsei Med J. – 2005. – Vol.46.№5. – P.597-613.
160. Kimura, H. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and cytoprotectant / H. Kimura, N. Shibuya, Y. Kimura // Antioxid and redox sign. – 2012. – Vol.17. - №1. – P.45 - 57.
161. Kimura, Y. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress / Y. Kimura, H. Kimura // FASEB J. – 2004. – Vol. 18. – P. 1165–1167.

162. Klemenska, E. Bioactivation of organic nitrates and the mechanism of nitrate tolerance / E. Klemenska, A. Bersewicz // *Cardiol. J.* – 2009. – Vol.16. – P.11-19.
163. Koppenol, W.H. Chemistry of peroxynitrite and its relevance to biological systems / W. H. Koppenol // *Met Ions Biol Syst.* – 1999. – P. 597-619.
164. Kroemer, G. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death / G. Kroemer, L. Galluzzi, C. // *Brenner Physiol Rev.* – 2007. – Vol. 87.№1. – P.99-163.
165. Lala, P.K. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression / P.K. Lala, C. Chakraborty // *Lancet Oncol.* – 2001. - Vol.2.№3. – P.149-56.
166. Leibowitz, B. Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family / B. Leibowitz, J. Yu // *Cancer Biol Ther.* – 2010. – Vol.19.№6. – P.417-422.
167. Leise W., Mueller P.R. Multiple Cdk1 inhibitory kinases regulate the cell cycle during development / Leise W., Mueller P.R. // *Dev Biol.* – 2002. – Vol.249. – P.156-173
168. Li J.M. and Shah A.M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology / J. M. Li, F. M. Shah // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. R1014–R1030.
169. Loss of RB compromises specific heterochromatin modifications and modulates HP1alpha dynamics / H. Siddiqui, S.R. Fox, R.W. Gunawardena, E.S. Knudsen // *J. Cell. Physiol.* – 2007. – Vol.211. – P.131–137.
170. Lowicka, E. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // *Pharmacol Rep.* - 2007. – Vol.59. – P. 4 – 24.
171. Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review / M.N. Hughes, M.N. Centelles, K.P. Moore // *Free Radic Biol Med.* – 2009. –

Vol.10. – P.1346-1353.

172. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6 / M. Malumbres, R. Sotillo, D. Santamaria et al. // Cell. – 2004. – Vol.118. – P.493–504.

173. Mao, Z. Calcineurin enhances MEF2 DNA binding activity in calcium-dependent survival of cerebellar granule neurons / Z. Mao, M. Wiedmann // J Biol Chem. – 1999. – Vol.274.№43. – P.31102-31107.

174. MAP4K3 modulates cell death via the post-transcriptional regulation of BH3-only proteins / D. Lam, D. Dickens, E.B. Reid et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009. - Vol.106.№29. – P.11978-11983.

175. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer / Massague J. // Nature. - 2004. – Vol.432. – P.298–306.

176. Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase / S. Pou, L. Keaton, W. Surichamorn, G.W. Rosen // J Biol Chem. – 1999. – Vol.274. – P.9573–9580

177. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9 / E. N. Shiozaki, J. Chai, D. J. Rigotti et al // Mol. Cell. – 2003. – Vol. 11. – P. 519-527.

178. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9 / E. N. Shiozaki, J. Chai, D. J. Rigotti, S. J. Riedl, et al // Mol. Cell. – 2003. – Vol. 11. – P. 519-527.

179. Mikkelsen, R.B. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms / R.B. Mikkelsen, P. Wardman // Oncogene. – 2003. – Vol.22. – P.5734–5754.

180. Millard S.S., Koff A. Cyclin-dependent kinase inhibitors in restriction point control, genomic stability, and tumorigenesis / Millard S.S., Koff A. // J Cell Biochem Suppl. – 1998. – Vol.30-31. – P.37–42

181. Miller, M.R. Recent developments in nitric oxide donor drugs / M.R. Miller, I.L. Megson // Br J Pharmacol. – 2007. – Vol.151.№3. – P.305-321.

182. Mitochondrial and cellular heme-dependent proteins as targets for the bioactive function of the heme oxygenase/carbon monoxide system / M. Desmard,

J. Boczkowski, J. Poderoso et al. // *Antioxid Redox Signal.* – 2007. – Vol. 9, N12. – P.2139-2155.

183. Mitochondrial and cellular heme-dependent proteins as targets for the bioactive function of the heme oxygenase/carbon monoxide system / M. Desmard, J. Boczkowski, J. Poderoso et al. // *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING.* – 2007. – Vol. 9, N12. – P.2139-2155.

184. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization / D. Arnoult, B. Gaume, M. Karbowski et al. // *EMBO J.* – 2003. – Vol.22. – P.4385–4399

185. Mitogen-induced rapid phosphorylation of serine 795 of the retinoblastoma gene product in vascular smooth muscle cells involves ERK activation / M.N. Garnovskaya, Y.V. Mukhin, T.M. Vlasova et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 24899–24905.

186. Mitnacht, S. Vital cyclins / S. Mitnacht, C. Bosshof // *Rev. Med. Virol.* – 2000. – Vol.10. – P.175–184.

187. Molecular basis of cyclin-CDK-CKI regulation by reversible binding of an inositol pyrophosphate / Lee Y.S., Huang K., Quijcho F.A., O'Shea E.K. // *Nat Chem Biol.* – 2008. – Vol.4. – P.25-32.

188. Molecular mechanism of apoptosis: Prediction of three-dimensional structure of caspase-6 and its interactions by homology modeling / Sattar R., Ali S.A., Abbasi A. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – Vol.308. - P.497–504.

189. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints / A. Sancar, L.A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, S. Linn // *Annu. Rev. Biochem.* - 2004. – Vol.73. – P.39-85.

190. Morris S. M. J. Recent advances in arginine metabolism / S. M. J. Morris // *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* – 2004. - №7. – P. 45–51.

191. Morris, S.M. J. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge /S. M. J. Morris // *J Nutr.* – 2007. – Vol. 137. - 1602S–1609S.

192. Motterlini, R. The therapeutic potential of carbon monoxide / R.

Motterlini, L.E. Otterbein // Nat. Rev. Drug Discov. – 2010. – Vol.9. – P.728–743.

193. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins / K. Kozar, M.A. Ciemerych, V.I. Rebel et al. // Cell. – 2004.- Vol.118.№4. – Vol.477-491.

194. Mustafa, A.K. Signaling by Gasotransmitters / A.K. Mustafa, M.M. Gadalla, S.H. Snyder // Sci Signal. – 2009. – Vol.2. – P.1-17.

195. Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage / J. Seoane, H.V. Le, J. Massagué // Nature. – 2002. – Vol.419. – P.729-734.

196. Nagy, P. Rapid reaction of hydrogen sulfide with the neutrophil oxidant hypochlorous acid to generate polysulfides / P. Nagy, C.C. Winterbourn // Chem Res Toxicol. – 2010. – Vol.23. - 1541-1543.

197. Nagy, P. Redox chemistry of biological thiols. In: Advances in Molecular Toxicology / P. Nagy, C.C. Winterbourn // ed. James CF. Elsevier. - 2010.- Chapter 6. – P. 183–222.

198. Nakamura, T. Emerging roles of Snitrosylation in protein misfolding and neurodegenerative diseases / T. Nakamura, S. A. Lipton // Antioxid Redox Signal. – 2008. - № 10. – P. 87–101.

199. Neganova I., Lako M. G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells / Neganova I., Lako M. // J.Anat. – 2008. – Vol. 213. – P. 30–44.

200. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation / C.Y. Wang, M.W. Mayo, R.G. Korneluk // Science. – 1998. – Vol.281. – P.1680–1683.

201. Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression / Hemish J., Nakaya N., Mittal V. // J Biol Chem. - 2003. – Vol.278. – P. 42321–42329.

202. Nitric oxide and carbon monoxide act as inhibitory neurotransmitters in the longitudinal muscle of C57BL/6J mouse distal colon / A. Hidaka, Y.T. Azuma, H. Nakajima, T. Takeuchi // J Pharmacol Sci. – 2010. – Vol.112. – P.231-

241.

203. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease / P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet // *Physiol. Rev.* - 2007. – Vol.87. – P. 315-424.

204. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator / B.M. Choi, H.O. Pae, S.I. Jang, Y.M. et al. // *J Biochem Mol Biol.* – 2002. – Vol.35.№1. – P.116-26.

205. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology / Tuteja N., Chandra M., Tuteja R. // *J Biomed Biotechnol.* - 2004. - N4. - P. 227–237

206. Nitric oxide induces airway smooth muscle cell relaxation by decreasing the frequency of agonist-induced Ca^{2+} oscillations / J.F. Perez-Zoghbi, Y. Bai, M.J. Sanderson // *J Gen Physiol.* – 2010. - Vol.135. №3. – P.247-59.

207. Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition / S. Hortelano, B. Dalloporta, N. Zamzami // *FEBS Letters.* - 1997. - Vol. 410. - P. 373–377.

208. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle / K. Fukuo, S. Hata, T. Suhara // *Hypertension.* – 1996. – Vol.27. – P.823–826.

209. Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase / M.G. Mason, P. Nicholls, M.T. Wilson // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103. – P. 708–713.

210. Nitric oxide inhibits tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by reducing the generation of ceramide / C. De Nadai, P. Sestili, O. Cantoni et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – Vol.97.№10. – P.5480-5485

211. Nitric oxide sensitizes prostate carcinoma cell lines to TRAIL-mediated apoptosis via inactivation of NF- κ B and inhibition of Bcl-xl expression / S. Huerta-Yepez, M. Vega, A. Jazirehi // *Oncogene.* – 2004.- Vol.23. – P. 4993–5003.

212. Nitric oxide synthase generates nitric oxide locally to regulate

compartmentalized protein S-nitrosylation and protein trafficking / Y. Iwakiri, A. Satoh, S. Chatterjee et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103. – P. 19777–19782

213. Nitric oxide synthase II suppresses the growth and metastasis of human cancer regardless of its upregulation of protumor factors / X. Le, D. Wei, S. Huang et al. // *Proc Natl Acad Sci.* -2005. – Vol.102. – P.12-24

214. Nitric oxide control of proliferation in nerve cells and in tumor cells of nervous origin / E. Peña-Altamira, P. Petazzi , A. Contestabile // *Curr Pharm Des.* – 2010. – Vol.16. – P.440-450.

215. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9 / N.J. Török, H. Higuchi, S. Bronk, G.J. Gores // *Cancer Res.* – 2002. – Vol.62. – P.1648-1653.

216. Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation / Y. Maejima, S. Adachi, K. Morikawa et al. // *Mol Cell Cardiol.* – 2005. – Vol.38. -P.63-74.

217. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms / A. Martínez-Ruiz, S Cadenas, S. Lamas // *Free Radic Biol Med.* – 2011. – Vol.51. – P.17-29.

218. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis / E. Oda, R. Ohki, H. Murasawa et al. // *Science.* – 2000. – Vol.288. – P.1053–1058.

219. NPAS2: A gas-responsive transcription factor / E.M. Dioum, J. Rutter, J.R. Tuckerman et al. // *Science.* - 2002. – Vol.298. – P. 2385–2387.

220. Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel / L.M. Dejean, S. Martinez-Caballero, L. Guo et al. // *Mol Biol Cell.* – 2005. – Vol.16. – P.2424–2432.

221. Ollinger, R. Bilirubin: a natural inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation / R. Ollinger, M. Bilban, A. Erat // *Circulation.* – 2005. – Vol.112 – P.1030-1039.

222. Olsona, S.Y. Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer / S.Y. Olsona, H.J. Garbana // Nitric Oxide. - 2008. – Vol.19. – P.1-14.
223. Orrenius, S. Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free / S. Orrenius, B. Zhivotovsky // Nat Chem Biol. – 2005. – Vol. 1.№4. – P.188-189.
224. Otterbein, L.E. Carbon monoxide: innovative anti-inflammatory properties of an age-old gas molecule / L. E. Otterbein // Antioxid Redox Signal. – 2002. - № 4. – P. 309–319.
225. p38 MAP kinase plays a role in G2 checkpoint activation and inhibits apoptosis of human B cell lymphoma cells treated with etoposide / T. Kurosu, Y. Takahashi, T. Fukuda et al.// Apoptosis. - 2005. – Vol.5. – P.1111-1120.
226. p38 Mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activities have opposite effects on human neutrophil apoptosis / M. Alvarado-Kristensson, M.I. Porn-Ares, S. Grethe et al. // FASEB J. – 2002. – Vol.16.№1. - 129-131.
227. p38 MAP kinase and ERK play an important role in nitric oxide-induced apoptosis of the mouse embryonic stem cells / J.H. Lee, S.W. Lee, S.H. Choi et al. // Toxicol In Vitro. – 2013. - Vol.27. №1. – P.492-498.
228. p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils / M. Alvarado-Kristensson, F. Melander, K. Leandersson et al. // J Exp Med. – 2004. – Vol.199№4. – P.449-458.
229. P53-regulated transcriptional program associated with genotoxic stress-induced apoptosis / P.S. Kho, Z. Wang, L. Zhuang et al.// J Biol Chem. – 2004. – Vol.279. – P.21183–21192.
230. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis / T. Fujita, K. Toda, A. Karimova et al. // Nat. Med. 2001. – Vol.7. – P.598–604.
231. Parameswaran, N. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages / N. Parameswaran, S. Patial // Crit Rev Eukaryot Gene Expr. – 2010. – Vol. 20. – P. 87–103.

232. Pathways to caspase activation / Z.B. Wang, Y.Q. Liu, Y.F. Cui // Biol Int. – 2005. – Vol. 29. – P. 489–496
233. Pathways to caspase activation / Z.B. Wang, Y.Q. Liu, Y.F. Cui // Biol Int. – 2005. – Vol. 29. – P. 489–496
234. Peers, C. Acute oxygen sensing: Diverse but convergent mechanisms in airway and arterial chemoreceptors / C. Peers, P.J. Kemp // Respir Res. – 2001. – Vol.2. – P.145–149.
235. Perspective on recent developments on sulfur-containing agents and hydrogen sulfide signaling / C. Jacob, A. Anwar, T. Burkholz // Planta Med. – 2008.- Vol. 74. – P. 1580–1592
236. Pharmacological modulation of nitric oxide release: new pharmacological perspectives, potential benefits and risks / R. Scatena, P. Bottoni, A. Pontoglio, B. Giardina // Curr. Med. Chem. – 2010. – Vol.17. – P.61-73.
237. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition / S. Dutertre, M. Cazales, M. Quaranta et al.// J. Cell Sci. – 2004. – Vol.117. – P.2523 -2531.
238. Physiological roles of mitogen-activated-protein-kinase-activated p38-regulated/activated protein kinase / S. Kostenko, G. Dumitriu, K.J. Læg Reid, U. Moens // World J Biol Chem. – 2011. - Vol.2. – P.73-89.
239. Piantodosi C.A. Biological chemistry of carbon monoxide / C. A. Piantodosi // Antioxid and redox sign. – 2002. - Vol.4. - №2. – P. 259-270.
240. Pietri, R. Hydrogen sulfide and heme proteins: knowledge and mysteries / R. Pietri, E. Román-Morales, J López-Garriga // Antioxid Redox Signal. – 2011. – Vol.15.№2. – P.393-404.
241. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? / D. Fulton, J.P. Gratton, W.C. Sessa // J Pharmacol Exp Ther. – 2001. - Vol. 299. - P. 818–824. [PubMed: 11714864]
242. Potter, L.R. Guanylyl cyclase structure, function and regulation / L.R. Potter // Cell Signal. – 2011. – Vol.12. – P.1921-1926.
243. Poznic, M. Retinoblastoma protein: a central processing unit / Poznic

M. // J. Biosci. – 2009. – Vol.34. – P.305–312.

244. Predmore, B.L. Development of hydrogen sulfide-based therapeutics for cardiovascular disease / B. L. Predmore, D. J. Lefer // J Cardiovasc Transl Res. – 2010. - № 3. – P. 487–498.

245. Pre-processed caspase-9 contained in mitochondria participates in apoptosis / P. Costantini, J.M. Bruey, M. Castedo et al. // Cell Death Differ. – 2002. – Vol. 9. – P.82–88.

246. Protective effect of carbon monoxide in transplantation / A. Nakao, A.M. Choi, N. Murase // J. Cell Mol. Med. – 2006. – Vol.10. – P. 650–671.

247. Protective effect of carbon monoxide-releasing compounds in ischemia-induced acute renal failure / T. Vera, J.R. Henegar, H.A. Drummond et al. // J.Am.Soc.Nephrol. – 2005. – Vol.16. – P.950–958.

248. Protein S-nitrosylation: purview and parameters / D. T. Hess, A. A. Matsumoto, S. O. Kim // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2005. -№ 6. – P. 150–166.

249. Radical causes of cancer / S.P. Hussain, L.J. Hofseth, C.C. Harris // Nat Rev Cancer . – 2003. – Vol.3. – P. 276–285.

250. Randomized phase II trial comparing nitroglycerin plus vinorelbine and cisplatin with vinorelbine and cisplatin alone in previously untreated stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer / H. Yasuda, M. Yamaya, K. Nakayama et al. // J Clin Oncol. – 2006. – Vol.24. – P.688–694.

251. Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide / G. Filomeni, K. Aquilano, G. Rotilio et al. // Cancer Res. – 2003. – Vol. 63. – P. 5940–5949

252. Reagan-Shaw, S. Combination of vitamin E and delenium causes an induction of apoptosis of human prostate cancer cells by enhancing the Bax/Bcl-2 ration / S. Reagan-Shaw, M. Nihal, H. Ahsan // Prostate. – 2008. – Vol.68. – P.1624–1634.

253. Redox regulation of cell survival / D. Trachootham, W. Q. Lu, M. A. Ogasawara et al. // Antioxid Redox Signal. – 2008. – Vol. 10. – P. 1343–1374.

254. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises / Y.M. Janssen-Heininger, B.T. Mossman, N.H. Heintz et al. // *Free Radic Biol Med.* – 2008. – Vol.45.№1. – P.1-17.
255. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling / Y.S. Bae, H. Oh, S.G. Rhee, Y.D. Yoo // *Mol Cells.* – 2011. – Vol.32.№6. – P.491-509.
256. Repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma protein / R.J. White, J. Trouche, K. Martin et al. // *Nature.* – 1996. – Vol.382. – P.88–90.
257. Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias / E. Sicinska, I. Aifantis, L. Le Cam et al.// *Cancer Cell.* – 2003. – Vol.4.№6. – P.451-461.
258. Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect / D.P. Ballou, Y. Zhao, P.E. Brandish et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2002. - Vol. 99. - P. 12097–12101.
259. Rising behind NO: cGMP- dependent protein kinases / F. Hofmann, A. Ammendola, J. Schlossmann // *J Cell Sci.* - 2000. – Vol. 113. – P. 1671–1676.
260. Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue / J. Saklatvala, L. Rawlinson, R.J. Waller, S. Sarsfield et al.// *J Biol Chem.* 1996 Mar 22;271(12):6586-9. PMID: 8636072
261. Role of Bim in diallyl trisulfide-induced cytotoxicity in human cancer cells / B. C. Lee, B. H. Park, S. Y. Kim et al. // *J Cell Biochem.* – 2011. – Vol. 112. – P. 118–127.
262. Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia / F. Fresquet, F. Pourageaud, V. Leblais et al. // *Br J Pharmacol.* – 2006. – Vol. 148. - 714–723.
263. Rubin, E. Site-specific and temporally regulated retinoblastoma protein dephosphorylation by protein phosphatase type I / Rubin E., Mittnach S.,

Villa-Moruzzi E., Ludlow J.W. // *Oncogene*. – 2001. – Vol.20. – P.3776–3785

264. Rustin, P. Mitochondria and cancer / P. Rustin, G. Kroemer // *Ernst Schering Found Symp Proc.* - 2007. – Vol.4. – P.1-21.

265. Salvesen, G.S. IAP proteins: blocking the road to death's door / G.S. Salvesen, C.S. Duckett // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2002. – Vol. 3. – P.401-410.

266. Scorrano, L. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members / L. Scorrano, S.J. Korsmeyer // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – Vol.304. – P.437-444.

267. Selective inhibition of rRNA transcription downregulates E2F-1: a new p53-independent mechanism linking cell growth to cell proliferation / G. Donati, E. Brighenti, M. Vici // *J Cell Sci.* - 2011 – Vol.124. – P.3017-3028.

268. Sen, N. Protein modifications involved in neurotransmitter and gasotransmitter signaling / N. Sen, S.H. Snyder // *Trends Neurosci.* - 2010. – Vol.33. – P.493-502.

269. Sherr, C.M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases / C.M. Sherr, J.M. Roberts // *Genes Dev.* – 2004. – Vol.18. – P.2699–2711.

270. Silke, J. The regulation of TNF signalling: what a tangled web we weave / J. Silke // *Curr Opin Immunol.* – 2011. – Vol.23. – P.620-626.

271. Singh, S. Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies / S. Singh, A.K. Gupta // *Cancer Chemother Pharmacol.* - 2011. – Vol.67. – P.1211–1224.

272. S-nitrosylation in health and disease / M. W. Foster, T. J. McMahon, J. S. Stamler // *Trends Mol Med.* – 2003. – Vo. 9. – P. 160–168.

273. S-nitrosylation in health and disease [текст] / M. W. Foster, T. J. McMahon and J. S. Stamler // *Trends Mol Med.* – 2003. – Vo. 9. – P. 160–168

274. S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. A novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis / N. Azad, V. Vallyathan, L. Wang, V. Tantishaiyakul, C. Stehlik, S.S. Leonard, Y. Rojanasakul // *J Biol Chem.* - 2006. – Vol.281.№45. – P.34124-34

275. Sodha, N.R. Hydrogen sulfide therapy attenuates the inflammatory

response in a porcine model of myocardial ischemia/reperfusion injury / N. R. Sodha, R. T. Clements, J. Feng et al. // J Thorac Cardiovasc Surg. – 2009. - Vol. 138. – P. 977–984.

276. Song, R. Carbon monoxide inhibits human airway smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway / R. Song, R.S. Mahidhara, F. Liu, W. Ning, L.E. Otterbein, A.M. Choi // Am J Respir Cell Mol Biol. - 2002. - Vol.5. – P.603-610.

277. Song, R. Carbon monoxide promotes Fas/CD95-induced apoptosis in Jurkat cells / R. Song, Z. Zhou, P.K. Kim, R.A. Shapiro, F. Liu, C. Ferran, A.M. Choi, L.E. Otterbein // J Biol Chem. - 2004. – Vol.279. – P.44327 – 44334.

278. Song, R. Carbon monoxide promotes Fas/CD95-induced apoptosis in Jurkat cells / R. Song, Z. Zhou, P.K. Kim, R.A. Shapiro, F. Liu, C. Ferran, A.M. Choi, L.E. Otterbein // J Biol Chem. – 2004. – Vol.279. – P. 44327 – 44334.

279. Song, R. Carbon monoxide promotes Fas/CD95-induced apoptosis in Jurkat cells / R. Song, Z. Zhou, P.K. Kim, R.A. Shapiro, F. Liu, C. Ferran, A.M. Choi, L.E. Otterbein // J Biol Chem. - 2004. – Vol.279. – P.44327 – 44334.

280. Stassi, G. Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus / G. Stassi, R. De Maria, G. Trucco // J Exp Med. - 1997. – Vol.186. – P.1193–1200.

281. Strniskova, M. Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes / M. Strniskova, M. Baranèík, T. Ravingerová // Gen. Physiol. Biophys. - 2002. – Vol.21. – P. 231-255.

282. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain / Y. Huang, Y.C. Park, R.L. Rich et al. // Cell. – 2001. – Vol. 104. – P. 781 - 90.

283. Sulfasalazine induces haem oxygenase-1 via ROS-dependent Nrf2 signalling, leading to control of neointimal hyperplasia / J.Y. Kim, H.J. Cho, J.J. Sir // Cardiovasc Res. – 2009. – Vol.82. – P.550-60.

284. Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide derived reactive intermediates / D. A. Wink, J. A. Cook, S. Kim et al. // J.

Biol. Chem. - 1997 . Vol. 272. – P. 11147–11151.

285. Suppression of inflammatory cytokine production and oxidative stress by CO-releasing molecules–liberated CO in the small intestine of thermally-injured mice / D-m. Liu, B-w. Sun, Z-w. Sun et al. // *Acta Pharmacol Sin.* – 2008. – Vol.29. – P.838–846.

286. Taille C. Mitochondrial respiratory chain and NAD(P)H oxidase are targets for the antiproliferative effect of carbon monoxide in human airway smooth muscle / C. Taille, J. El-Benna, S. Lanone // *J Biol Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 25350–25360.

287. Tang, G. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels / G. Tang, L. Wu, R. Wang // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2010. – Vol. 37. – P. 753–763.

288. Targeted inhibition of p57 and p15 blocks transforming growth factor beta-inhibited proliferation of primary cultured human limbal epithelial cells / Z. Chen, D.Q. Li et al. // *Mol Vis.* – 2006. – Vol.12. – P.983-994.

289. Tennyson, A.G. Generation, translocation, and action of nitric oxide in living systems / A.G. Tennyson, S.J. Lippard // *Chem Biol.* – 2011. – Vol.18. – P.1211-1220. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.09.009.

290. The anti-apoptotic Bcl-x(L) protein, a new piece in the puzzle of cytochrome c interactome / I. Bertini, S. Chevance, R. Del Conte et al. // *PLoS One.* – 2011. – Vol.6.№4Ю - e18329.

291. The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology / L.A. Ridnour, D.D. Thomas, S. Donzelli et al.// *Antioxid Red Signal.* – 2006. – Vol.8. – P.1329–1337.

292. The Chemical Biology of NO. Insights into Regulation, Protective and Toxic Mechanisms of Nitric Oxide / D. A. Wink, I. Hanbauer, M. B. Grisham et al. // *Current Topics in Cellular Regulation.* – 1996. –Vol. 34. – P. 159–187.

293. The crystal structure of human cyclin B / E.T. Petri, A. Errico, L. Escobedo, T. Hunt, R. Basavappa // *The Cell Cycle.* - 2007. –Vol.6. – P.1342–1349.

294. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: An endogenous

peroxynitrite 'scavenger'? / M. Whiteman, J. S. Armstrong, S. H. Chu et al. // *J Neurochem.* – 2004. – Vol. 90. – P. 765–768.

295. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway links the DNA mismatch repair system to the G2 checkpoint and to resistance to chemotherapeutic DNA-methylating agents / Y. Hirose, M. Katayama, D. Stokoe et al. // *Mol Cell Biol.* – 2003. – Vol.23.№22. – P.8306-8315.

296. The Raf-MEK-ERK cascade represents a common pathway for alteration of intracellular calcium by Ras and protein kinase C in cardiac myocytes / P.D. Ho, D.K. Zechner, H. He et al. // *J Biol Chem.* – 1998. – Vol. 273.№34. – P.21730-21735.

297. The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment / Elkholi R, Floros KV, Chipuk JE. // *Genes Cancer.* – 2011. – Vol.2.№5. - 523-537.

298. The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases / N.R. Brown, M.E.M. Noble, J.A. Endicott, L.N. Johnson // *Nat. Cell Biol.* - 1999. – Vol.1. – P.438–443.

299. The structure of CDK4/cyclin D3 has implications for models of CDK activation / T. Takaki, A. Echaliier, N.R. Brown et al. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* - 2009. – Vol.106. – P.4171–4176.

300. The truncated oxygen-avid hemoglobin from *Bacillus subtilis*: X-ray structure and ligand binding properties / L. Giangiacomo, A. Ilari, A. Boffi et al. // *J Biol Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 9192–9202.

301. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53 / D. Dornan, I. Wertz, H. Shimizu, D. Arnott et al. // *Nature.* – 2004. – Vol.429. – P.86–92.

302. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener / W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu // *EMBO J.* – 2001. – Vol. 20. – P. 6008–6016.

303. The Apaf-1-binding protein Aven is cleaved by Cathepsin D to unleash its anti-apoptotic potential / I.M. Melzer, S.B. Fernández, S. Böscher et al. //

Cell Death Differ. – 2012. – Vol.19.№9. – P.1435-45.

304. Thornton, T.M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival / T.M. Thornton // *Int J Biol Sci.* - 2009. – Vol. 5. – P.44-51.

305. Tiranti, V. Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy / V. Tiranti, C. Viscomi, T. Hildebrandt et al. // *Nat Med.* – 2009. – Vol. 15. – P. 200–205.

306. Tiwari, M. Antimetabolites: Established cancer therapy / M. Tiwari // *J.Can.Res. Ther.* – 2012. – Vol.8. – P.510-519.

307. Toledo, J.C.Jr. Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide / J.C.Jr. Toledo, O. Augusto // *Chem. Re. Toxicol.* – 2012. –Vol.25. – P.975-989. doi: 10.1021/tx300042g.

308. Tran, C.T. The DDAH/ADMA/NOS pathway / C.T. Tran, J.M. Leiper, P. Vallance // *Atheroscler Suppl.* – 2003. - № 4. – P. 33– 40.

309. Transcriptional control of human p53-regulated genes / T. Riley, E. Sontag, P. Chen, A. Levine // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2008. – Vol.9. – P.402–412.

310. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53 / U.M. Moll, S. Wolff, D. Speidel, W. Deppert // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2005. – Vol.17. – P.631–636.

311. Treatment with CO-RMs during cold storage improves renal function at reperfusion / A. Sandouka, B.J. Fuller, B. E. Mann et al. // *Kidney Int.* – 2006. – Vol. 69. – P. 239–247.

312. Tsujimoto, Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? / Y. Tsujimoto // *Genes Cells.* – 1998. – Vol.3. - P.697-707.

313. Tumour maintenance is mediated by eNOS / K.H. Lim, B.B. Ancrile, D.F. Kashatus // *Nature.* – 2008. – Vol.452. – P.646–649.

314. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases / D. J. Stuehr, J. Santolini, Z. Q. Wang // *J Biol Chem.* – 2004. - Vol. 279. –

P.36167–36170.

315. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases / D. J. Stuehr, J. Santolini, Z. Q. Wang et al. // J Biol Chem. – 2004. - Vol. 279. – P.36167–36170.

316. Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species / P. Goyal, N. Weissmann, F. Grimminger et al. // Free Radic Biol Med. – 2004. – Vol. 36. – P. 1279–1288

317. Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges / R. Foresti, M.G. Bani-Hani, R. Motterlini // Intensive Care Med. – 2008. – Vol.34. – P.649–658.

318. UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p38 activated upstream stimulation factor-1(USF-1) / S. Corre, A. Primot, E. Sviderskaya, D.C. Bennett // J.Biol.Chem. –2004. –Vol.279. –P.51226-51233

319. Van Engeland, M. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure / M. Van Engeland, L. J. W. Nieland, F. C. S. Ramaekers // Cytometry. – 1998. – Vol. 31. – P. 1-9.

320. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide / N. Shibuya, Y. Mikami, Y. Kimura // J Biochem. – 2009. – Vol. 146. – P. 623–626.

321. Vaux D.L., Silke J. IAPs, RINGs and ubiquitylation / Vaux D.L., Silke J. // Nature Reviews Molecular Cell Biology. - 2005. - Vol.6. – P. 287–297

322. Vieira, H.L. The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, 4-hydroxynonenal / H.L. Vieira, A.S. Belzac, D. Haouzi // Oncogene. - 2001. – Vol.20. – P.4305–4316.

323. Vital functions for lethal caspases / S. Launay, O. Hermine, M. Fontenay, G. Kroemer et al. // Oncogene. – 2005. – Vol.24. – P. 5137–5148.

324. Wang, R. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide / Wang R. // Antioxid Redox Signal. - 2003. – Vol.5 . – P.493 – 501.

325. Wang, R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? / R. Wang // *FASEB J.* - 2002. – Vol.16. – P.1792 – 1798.
326. Wenger, R.H. Mammalian oxygen sensing, signaling and gene regulation / R.H. Wenger // *Exp Biol.* – 2000. – Vol.23. – P.1253–1263.
327. Wink, D.A. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide / D. A. Wink, J. B. Mitchell // *Free Radic Biol Med.* – 1998. – Vol. 25. – P. 434–456.
328. Wondrak, G.T. Redox-directed cancer therapeutics: Molecular mechanisms and opportunities / G. T. Wondrak // *Antioxid Redox Signal.* – 2009. – Vol. 11. – P. 3013–3069.
329. Wong, S. Deacetylation of the retinoblastoma tumour suppressor protein by SIRT1 / S. Wong, J.D. Weber // *Biochem. J.* – 2007. – Vol.407. – P.451–460
330. Wu, L. Carbon monoxide - endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications / L. Wu, R. Wang // *Pharmacology Reviews.* – 2005. – Vol. 57. – P.585–630.
331. Yasuda, H. Solid tumor physiology and hypoxia-induced chemo/radio-resistance: novel strategy for cancer therapy: nitric oxide donor as a therapeutic enhancer / H. Yasuda // *Nitric Oxide.* - 2008. – Vol. 19. – P.205-216..
332. Yip, K.W. Bcl-2 family proteins and cancer / K.W. Yip, J.C. Reed // *Oncogene.* – 2008. – Vol.27. – P.6398–6406.
333. Yuan, C.Q. Structure and function of caspases / C.Q.Yuan, Z.H. Ding // *Guowai Yixue Fenzi Shengwuxue Fence.* – 2002. – Vol. 24. – P.146–151
334. Zhu, H. Signal transduction. How do cells sense oxygen? / H. Zhu, H.F. Bunn // *Science.* – 2001. – Vol.292. – P.449–451
335. Zuckerbraun, B.S. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1 / Zuckerbraun B.S., Billiar T. R. // *J. Exp. Med.* - 2003. – Vol.198. – P.1707-1716.
336. Zuckerbraun, B.S. Therapeutic delivery of carbon monoxide:

WO2008/003953 / B.S. Zuckerbraun// Expert Opinion on Therapeutic Patents. -
2008. – Vol.2. – P. 1321-1325.