

ТАШИРЕВА

Любовь Александровна

**РОЛЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ГАЗОВЫХ
ТРАНСМИТТЕРОВ В МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ
РЕАЛИЗАЦИИ АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ
КЛЕТОК КРОВИ**

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Рязанцева Наталья Владимировна

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

Новицкий Вячеслав Викторович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой биохимии с курсами
медицинской, фармацевтической и
токсикологической химии ГБОУ ВПО
«Красноярский государственный
медицинский университет имени
профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Минздрава России

Салмина Алла Борисовна

доктор медицинских наук, заведующий
лабораторией иммунологии и клеточных
биотехнологий Медицинского научно-
практического центра Инновационного
парка Балтийского федерального университета
имени Иммануила Канта

Литвинова Лариса Сергеевна

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение
Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии Российской
академии медицинских наук (г. Москва)

Защита состоится « 25 » сентября 2014 г. в 9-00 часов на заседании
диссертационного совета Д 208.096.01 Сибирского государственного медицинского
университета (634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО
СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://www.ssmu.ru/>

Автореферат разослан « » _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Апоптоз является генетически запрограммированным защитным механизмом, который направлен на запуск самоуничтожения патологически измененных, мутировавших клеток [Ярилин А.В., 2005]. Неспособность делящихся клеток перейти к апоптозу после произошедших серьезных нарушений ДНК лежит в основе опухолевой трансформации [Choudhari S.K. et. al., 2013].

Несмотря на большое количество экспериментальных данных, касающихся программированной клеточной гибели, до сих пор не исследованными остаются многие механизмы ее регуляции. В последнее время всё больший интерес представляет трансдукция сигналов апоптоза с помощью оксида азота (NO), оксида углерода (CO) и сульфида водорода (H₂S). Три этих вещества составляют семейство газовых трансммиттеров, с присущими им схожими внутриклеточными эффектами [Wang R., 2012]. Они обладают противовоспалительным и вазодилаторным действием, участвуют в регуляции клеточного цикла, а также принимают участие в системе ноцицепции и др. [Ufnal M., Zera T., 2010]. Предполагается, что работают данные газовые трансммиттеры на уровне активации p38 MAP киназы, однако, конкретные молекулярные пути не установлены [Lv M. et al, 2014].

Степень разработанности темы исследования. К настоящему времени, несмотря на интенсивные исследования роли внутриклеточных газовых трансммиттеров в реализации апоптоза, не существует детальной картины данного процесса. Установлено, что не только тип клеток, но и пути активации апоптоза детерминируют анти- либо проапоптотический эффект NO, CO и H₂S [Fang M., 2004]. В ряде работ продемонстрирована антиапоптотическая роль газовых трансммиттеров: нитрозилирование каспазы-3 приводит к подавлению развития внутреннего пути активации апоптоза, оксид углерода препятствует TNF-индуцированному апоптозу мышечных фибробластов, а сульфид водорода ингибирует апоптоз изолированных нейтрофилов человека [Petrache I., 2000; Adhikari Sh., Bhatia M., 2008; Saligrama P.T., 2014]. Показано как активирующее, так и ингибирующее влияние газотрансммиттеров на белки семейства Bcl-2 [Zhang X., 2003; Fang Y.Y., 2013; Wang G., 2013]. Кроме того, противоречивая информация накоплена по поводу влияния газотрансммиттеров на ключевые белки-регуляторы программированной клеточной гибели. В последнее время всё больший научный интерес вызывают белки-ингибиторы каспаз - xIAP и Aven, способные отменять апоптоз даже на самых поздних этапах [Jost P.J., 2009; Eissmann M., 2013]. Появляется всё больше данных о том, что, возможно, именно указанные протеины вовлечены в антиапоптотический механизм действия внутриклеточных газовых трансммиттеров [Majid A.S., 2013].

Помимо этого, имеются данные, демонстрирующие непосредственную роль NO в индукции генотоксических повреждений, а также участие в опухолевой промоции и прогрессии путем усиления ангиогенеза, роста опухолевых клеток и инвазии [Choudhari S.K., 2013]. Известен эффект оксида азота при сочетанном использовании с противоопухолевыми препаратами [Кондакова И.В., 2005].

Таким образом, предпринятое нами исследование позволит дополнить имеющиеся на сегодняшний день знания о месте и роли внутриклеточных газовых трансммиттеров в патогенезе опухолевой трансформации, а также определить

возможные молекулярные маркеры и новые подходы к патогенетически обоснованной коррекции изменений, сопровождающих опухолевую трансформацию клеток.

Цель исследования: идентифицировать молекулярные механизмы участия доноров газовых транмиттеров (оксида азота, сульфида водорода и монооксида углерода) в рецепторопосредованном и митохондриальном путях регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.

Задачи исследования:

1. Установить дозозависимость влияния доноров газовых транмиттеров (нитропруссид натрия (SNP), 3-(аминопропил)-1-гидрокси-3-изопропил-2-оксо-1-триазин (NOC-5), гидросульфид натрия (NaHS) и Ru(CO)₃Cl₂ димер (CORM-2)) на реализацию апоптоза клеток крови (линия Jurkat и моноклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров) *in vitro*.

2. Выявить закономерности изменения количества клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом и активности каспаз-3 и -9 при действии доноров оксида азота, сульфида водорода и монооксида углерода опухолевых клетках линии Jurkat *in vitro*.

3. Установить содержание белков семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x1, Bad) и белков-ингибиторов каспаз (xIAP, Aven), а также оценить экспрессию кодирующих их генов в опухолевых клетках линии Jurkat при воздействии доноров NO, H₂S и CO *in vitro*.

4. Оценить влияние доноров внутриклеточных газовых транмиттеров *in vitro* на систему TNF α -TNFR1 в опухолевых клетках линии Jurkat.

5. Установить роль MAP киназы p38 в модуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat при воздействии *in vitro* доноров оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода.

Научная новизна. Впервые идентифицирована роль доноров внутриклеточных газовых транмиттеров в рецепторопосредованном и митохондриальном путях реализации апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat. Проапоптотическое влияние указанных доноров носит специфический в отношении клеточных культур и дозозависимый характер. Установлено, что SNP в дозе 100 мМ, NOC-5 в концентрации 100 мкМ, NaHS в дозе 10мМ и CORM-2 в концентрации 50 мкМ р38-опосредованно участвуют в повышении количества клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом и приводят к повышению активности каспазы-3 *in vitro*. Выявлено, что используемые проапоптотические дозы доноров оксида азота (SNP в дозе 100 мМ и NOC-5 в дозе 100 мкМ) в клетках линии Jurkat вызывают повышение экспрессии гена *bax* и подавляют экспрессию генов *bcl-2*, *bcl-x1* и *xiap*, однако, содержание *in vitro* белка Bcl-x1 в данных условиях не изменяются, а содержание белков Bcl-2 и xIAP - повышают. Показано, что действие *in vitro* донора сульфида водорода (NaHS в дозе 10мМ) на клетки линии Jurkat сопровождается подавлением экспрессии генов *bcl-2*, *bcl-x1* и *bax*. В качестве белковой мишени H₂S-опосредованной программированной клеточной гибели выступает протеин Bad, что сопровождается компенсаторным повышением содержания белка Bcl-2. Доказано, что CORM-2 в концентрации 50 мкМ в клетках линии Jurkat приводит к снижению содержания антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL; содержание белка Bad повышается на фоне подавления экспрессии гена *in*

in vitro. Впервые продемонстрировано, что белок-регулятор апоптоза *xIAP* является мишенью действия доноров оксида азота (SNP в дозе 100 мМ и NOC-5 в дозе 100 мкМ) и монооксида углерода (CORM-2 в концентрации 50 мкМ) в клетках линии Jurkat *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость. Впервые получены знания фундаментального характера о влиянии газовых транмиттеров (NO, CO и H₂S) на молекулярные механизмы реализации апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat. Получены приоритетные данные о дозозависимости и избирательности действия газотранмиттеров, а также о роли p38 MAP киназы в механизмах влияния газовых транмиттеров на рецепторный путь апоптоза (TNFR1, TNF α), процессы активации каспаз-3 и -9 и дисбаланса белков семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_l и Bad) и белков-ингибиторов каспаз (*xIAP* и Aven). Впервые установлены общие закономерности оперирования, роль и молекулярные мишени действия газовых посредников в системе внутриклеточной сигнализации опухолевых клеток линии Jurkat. Полученные данные могут быть положены в основу разработки технологических основ таргетного управления системой внутриклеточных газовых транмиттеров, а также патогенетически обоснованной терапии при злокачественных новообразованиях с использованием модуляторов системы внутриклеточных газовых транмиттеров.

Методология и методы исследования:

В работе использовалась клеточная линия Jurkat (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург), а также мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров. В качестве доноров внутриклеточных газовых транмиттеров 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). Для изучения роли p38 MAPK использовался селективный ингибитор SB 203580. Оценку выраженности некротических и апоптотических изменений клеток, 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*, *bad* и *bad* оценивали методом ПЦР в режиме реального времени; определяли наличие в цитоплазме клеток белковых продуктов *xIAP*, *AVEN*, *Bcl-2*, *Bcl-X_L*, *Bad* методом вестерн-блоттинга, иммуноферментным анализом секретию клетками TNF- α , активность каспаз-3 и -9 методом спектрофотометрического анализа. Результаты проведенного исследования подвергали статистической обработке.

Положения, выносимые на защиту:

1. Действие доноров газовых транмиттеров *in vitro* характеризуется дозозависимостью и специфичностью эффекта на клетки крови (лейкозная линия Jurkat и мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров). Концентрации 100 мкМ NOC-5, 100 мМ SNP, 10 мМ NaHS и 50 мкМ CORM-2 способны вызывать апоптоз опухолевых клеток и не влияют на мононуклеарные лейкоциты, выделенные из крови здоровых доноров.

2. Проапоптотическое действие доноров газовых транмиттеров SNP, NOC-5, NaHS и CORM-2 (в опухолевых клетках линии Jurkat) сопряжено с повышением количества клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом и повышением активности каспазы-3.

3. Проапоптотический эффект доноров газовых трансмиттеров SNP, NOC-5, NaHS и CORM-2 не реализуется через TNF-рецепторный путь регуляции апоптоза; их эффекты опосредованы через p38 MAPK-зависимый дисбаланс белков семейства Bcl-2, а также белков-ингибиторов каспаз (xIAP и Aven) в опухолевых клетках линии Jurkat.

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); XVI Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 2010); V региональной конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева, «Актуальные вопросы экспериментальной и практической онкологии» (г. Томск, 2010); XVII Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 2011); Второй Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (г. Санкт-Петербург, 2011), Первая Европейская конференция, посвященная биологии сульфида водорода (Словакия, 2012).

Работа выполнена в рамках проектов Федеральных целевых программ «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» («Разработка технологических основ действия мишень-направленных биологически активных молекул для коррекции нарушения пролиферации и программированной гибели опухолевых клеток» ГК № 8302) и «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» («Роль внутриклеточных газовых трансмиттеров в регуляции гомеостаза клетки» ГК № П1311 и «Разработка технологии селективного управления внутриклеточной газовой сигнализацией» ГК 14.740.11.0932). 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.

Личное участие автора. Автор принимал непосредственное участие в планировании исследования и разработке методического подхода, анализе литературы. Автором проведены все исследования, статистическая обработка полученных данных и интерпретация результатов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 23 работы, из которых 12 - в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 178 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 40 рисунками и 22 таблицами.

Библиографический указатель включает 197 источника (17 отечественных и 180 иностранных).

ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛА И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу работы положены результаты исследования влияния внутриклеточных газовых трансмиттеров на апоптоз опухолевых клеток линии Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз), а также мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных при обследовании 26 относительно здоровых доноров (10 мужчин и 16 женщин в возрасте от 18 до 40 лет). Критериями включения доноров в программу исследования служили отсутствие у них хронических воспалительных заболеваний, онкологических, аутоиммунных, наследственных и психических болезней, алкогольная и наркотическая зависимости с соблюдением процедуры информированного согласия (заключение этического комитета №1275 от 01.03.10г.). Материалом исследования явились клетки опухолевой линии Jurkat полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург), и венозная кровь, полученная у здоровых доноров утром натощак (стабилизированная K_3 ЭДТА).

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

В соответствии с поставленными целью и задачами исследования был предложен методический подход, представленный в таблице 1.

Для изучения роли внутриклеточных газовых трансмиттеров в реализации апоптоза опухолевых клеток были использованы доноры данных молекул: нитропруссид натрия (SNP), 3-(аминопропил)-1-гидрокси-3-изопропил-2-оксо-1-триазин (NOC-5), гидросульфид натрия (NaHS) и $Ru(CO)_3Cl_2$ димер (CORM-2). Конечная концентрация CORM-2 и NOC-5 составляла 5, 50, 100 и 500 мкМ, SNP и NaHS – 10, 50, 100, 500, 1000 мМ. Клетки инкубировали в течение 15 мин и 24 ч. В качестве селективного ингибитора р38 MAP-киназы использовали SB 203580 в концентрации 0,2 мкМ в течение 30 мин.

Т-лимфобластные клетки человека линии Jurkat культивировались в RPMI-1640 («Invitrogen», США), дополненной в соотношении 9:1 эмбриональной телячьей сывороткой («Gibco Invitrogen», США), 0,3 мг/мл L- глутамином и 100 мкг/мл гентамицином в 5% CO_2 атмосфере при $37^{\circ}C$, с оптимальной плотностью $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Мононуклеарные клетки выделяли из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования [Натвиг Дж. и соавт., 1980]. Венозную кровь, стабилизированную K_3 ЭДТА 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 мононуклеарных лейкоцитов, собирали пипеткой с раздела фаз. Клетки трижды отмывали средой RPMI-1640, ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 900g. Жизнеспособность клеток оценивали по содержанию «мертвых» клеток, окрашенных трипановым синим («Serva», США).

Оценку количества апоптотически и некротически измененных клеток осуществляли с помощью набора реагентов «ANNEXIN V FITC» («Abcam», США).

Количество клеток со сниженным уровнем потенциала митохондриальных мембран ($\Delta\psi$) определяли с использованием набора реагентов «MitoScreen» («BD Pharmigen», США). Образцы клеточных суспензий анализировали на проточном цитофлуориметре FACS CantoII («Becton-Dickinson», США) с аргоновым лазером. Результаты выражали в %.

Таблица 1

Распределение экспериментальных клеточных моделей *in vitro*
в соответствии с использованными методами исследования

Методы исследования	Условия культивирования	Экспериментальные модели		
		Мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров	Культура клеток линии Jurkat	Культура клеток линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK
Оценка апоптоза клеток в аннексиновом тесте с использованием проточной лазерной цитофлуориметрии	Интактные клетки	26	26	26
	SNP (100 мМ)	26	12	12
	NOC-5 (100 мкМ)	26	12	12
	NaHS (10 мМ)	26	12	12
	CORM-2 (50 мкМ)	26	12	12
Оценка количества клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом с использованием проточной лазерной цитофлуориметрии	Интактные клетки	26	26	26
	SNP (100 мМ)	26	12	12
	NOC-5 (100 мкМ)	26	12	12
	NaHS (10 мМ)	26	12	12
	CORM-2 (50 мкМ)	26	12	12
Определение количества TNFR1-презентирующих клеток с использованием проточной лазерной цитофлуориметрии	Интактные клетки	26	26	26
	SNP (100 мМ)	26	12	12
	NOC-5 (100 мкМ)	26	12	12
	NaHS (10 мМ)	26	12	12
	CORM-2 (50 мкМ)	26	12	12
Исследование содержания белков-регуляторов апоптоза (Bad, Bcl-2, Bcl-X _L) и белков-ингибиторов каспаз (Aven и xIAP) с использованием метода вестерн-блоттинг	Интактные клетки	26	26	26
	SNP (100 мМ)	26	12	12
	NOC-5 (100 мкМ)	26	12	12
	NaHS (10 мМ)	26	12	12
	CORM-2 (50 мкМ)	26	12	12
Оценка экспрессии генов белков-регуляторов апоптоза (bad, bax, bcl-2, bcl-xl) и белков-ингибиторов каспаз (aven и xiap) с использованием метода ПЦР в реальном времени	Интактные клетки	26	26	26
	SNP (100 мМ)	26	12	12
	NOC-5 (100 мкМ)	26	12	12
	NaHS (10 мМ)	26	12	12
	CORM-2 (50 мкМ)	26	12	12
Исследование содержания TNF α в супернатантах культур клеток методом иммуноферментного анализа	Интактные клетки	26	26	26
	SNP (100 мМ)	26	12	12
	NOC-5 (100 мкМ)	26	12	12
	NaHS (10 мМ)	26	12	12
	CORM-2 (50 мкМ)	26	12	12
Оценка активности каспазы-3 и -9 методом спектрофотометрии	Интактные клетки	26	26	26
	SNP (100 мМ)	26	12	12
	NOC-5 (100 мкМ)	26	12	12
	NaHS (10 мМ)	26	12	12
	CORM-2 (50 мкМ)	26	12	12

Содержание клеток, презентующих на своей поверхности мембранную форму рецептора к фактору некроза опухоли- α 1-го типа TNF-RI (CD120), в клетках линии Jurkat и культурах мононуклеарных лейкоцитов крови определяли методом лазерной проточной цитофлуориметрии. Результаты выражали в %.

Определение концентрации TNF- α проводили в супернатантах культур клеток линии Jurkat и культур интактных мононуклеарных лейкоцитов методом иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией производителя тест-системы («Invitrogen», США). Результаты выражали в пг/мл.

Выделение РНК из клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов крови осуществляли сорбентно-колоночным методом (QIAmp RNA Blood mini Kit, QIAGEN, Германия). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием статистического праймера (N_9) и ДНК-зависимой РНК полимеразы (MMuLV-RT) («Promega», США). 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). Результаты выражали в отн. ед.

Для определения содержания белков – ингибиторов каспаз (AVEN, XIAP) и белков – регуляторов апоптоза (Bcl-2, Bcl- X_L , Bad) использовали метод вестерн-блоттинга. Разделение смеси белков проводили в 10% ДСН-ПААГ (SDS-PAGE) геле под действием электрического поля. Перенос белков производили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) электрофоретически. После блокирования неспецифического связывания 1% желатином нитроцеллюлозные блоты инкубировали с первичными антителами к ключевым регуляторам апоптоза. Использовали антитела к AVEN («Biosource», США), XIAP («Biosource», США), Bcl- X_L («Sigma», США), Bad («Biosource», США), Bcl-2 («Biosource», США)). Добавляли вторичные антитела с пероксидазной меткой («Biosource», США). Для визуализации результатов исследования использовали хемиллюминесцентный метод. Количественное содержание белков определяли путем подсчета интенсивности бенда на рентгеновской пленке с помощью программы TotalLab v.2.01. В качестве стандарта и внутреннего контроля использовали белок глицеро-3-фосфат-дегидрогеназу (АТ фирмы «Chemicon», США), выражая содержание исследуемых протеинов в усл. ед. Активность каспаз-3 и -9 изучали с помощью спектрофотометрического метода с использованием наборов фирмы «Abscam», USA. Результаты выражали в усл. ед.

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 средневыборочные характеристики: медиану, первый и третий квартили. Так как закон распределения исследуемых числовых показателей отличался от нормального, достоверность различий независимых выборок проверяли при помощи U-критерия Манна-Уитни (в случае парных независимых совокупностей), критерия Краскала-Уоллиса (в случае множественных независимых совокупностей). В случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением для оценки различий между зависимыми выборками применялся непараметрический критерий Вилкоксона. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ [Кремер Н.Ш., 2004].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние внутриклеточных газовых трансммиттеров на реализацию суицидальной программы клетки

На первом этапе нашего исследования была проведена проверка гипотезы о влиянии внутриклеточных газовых трансммиттеров на процесс апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови в условиях *in vitro* и клеток линии Jurkat. Для этого в условиях эксперимента оценивали количество некротически и апоптотически измененных мононуклеарных лейкоцитов и клеток линии Jurkat при различной длительности воздействия и концентрации доноров оксида азота, сульфида водорода и монооксида углерода (рисунок 1).

При анализе процентного содержания клеток, вступивших в апоптоз, нами было установлено, что воздействие в течение 15 мин SNP в концентрации 100 мМ, NaHS - в концентрации 10 мМ, а также воздействие в течение 24 ч NOC-5 в дозе 100 мкМ и CORM-2 в дозе 50 мкМ на клетки линии Jurkat вызывает достоверное повышение количества клеток, вступивших в апоптоз (рисунок 1). При этом указанные концентрации и продолжительность воздействия не вызвали статистически значимого повышения количества клеток линии Jurkat с некротическими изменениями ($p > 0,05$).

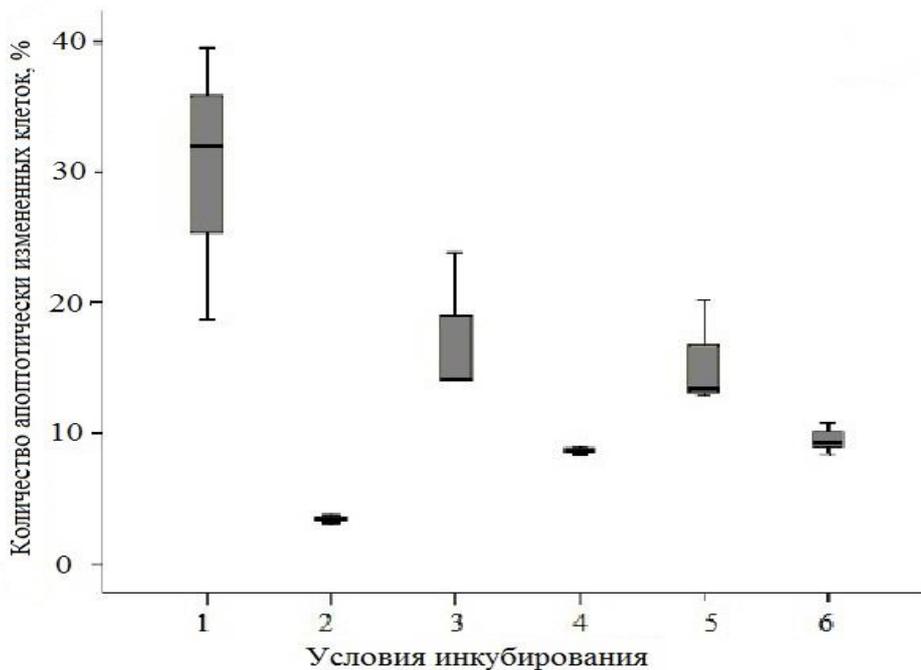


Рисунок 1. Количество клеток вступивших в апоптоз Me(Q₁-Q₃). Условия инку-бации, здесь и на рисунках 2-5:

1 – интактные мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров, 2 – интактные клетки линии Jurkat, 3 – клетки линии Jurkat при действии SNP в дозе 100 мМ; 4 – клетки линии Jurkat при действии NOC-5 в дозе 100 мкМ; 5 – клетки линии Jurkat при действии NaHS в дозе 10 мМ; 6 – клетки линии Jurkat при действии CORM-2 в дозе 50 мкМ

Вовлеченность митохондриального и рецепторного путей в механизмы апоптогенного действия внутриклеточных газовых трансммиттеров на клетки линии Jurkat

Далее выяснялись молекулярные механизмы, лежащие в основе выявленного влияния газовых трансммиттеров на программированную клеточную гибель. Нами

была проведена оценка состояния митохондриального пути инициации апоптоза в интактных клетках линии Jurkat.

Полученные на культуре Т-лимфобластных лейкоцитов результаты свидетельствовали о том, что повышение внутриклеточной концентрации оксида азота приводит к повышению количества клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом как при воздействии SNP в дозе 100 мМ, так и при NOC-5 в концентрации 100 мкМ (рисунок 2). Кроме того, нами было показано, что повышение внутриклеточной концентрации сульфида водорода и монооксида углерода также приводило к увеличению количества клеток линии Jurkat со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом (рисунок 2).

Стоит отметить, что повышение внутриклеточной концентрации сульфида водорода приводило к повышению количества клеток со сниженным $\Delta\psi$ в наименьшей степени по сравнению с другими газами, хотя использованная нами концентрация превышала физиологическую. Имеются данные, что H_2S способен открывать K_{ATP} каналы митохондрий, что приводит к серии внутриклеточных событий и сохранению митохондриальной целостности [Zhang et al., 2007]. Возможно, именно это свойство сульфида водорода лежит в основе стабилизации митохондрий и предотвращения коллапса митохондриального дыхания, происходящего при воздействии оксида азота и монооксида углерода.

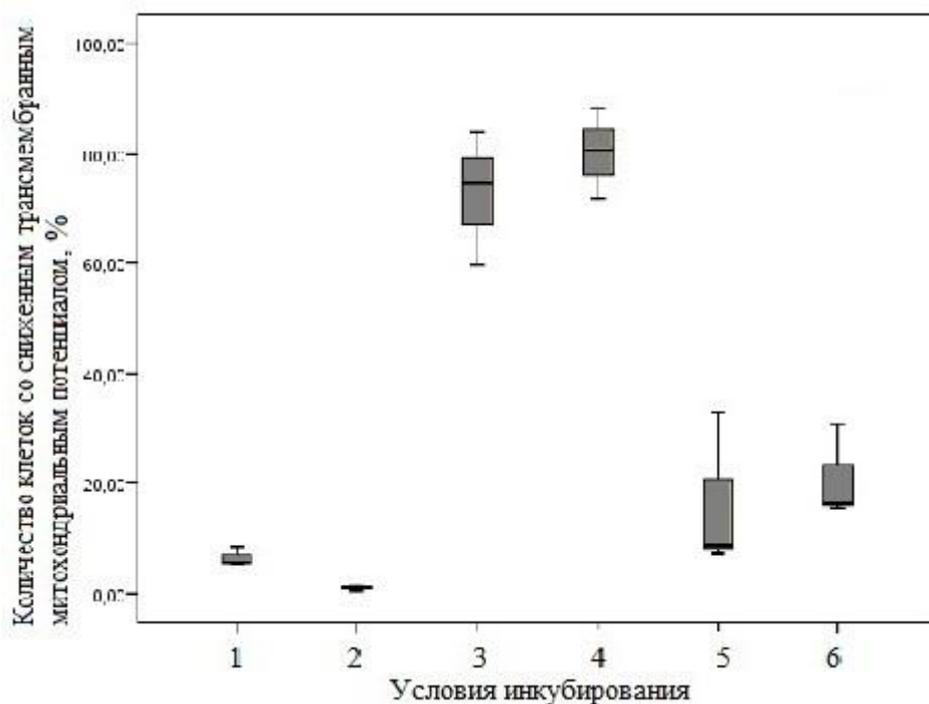


Рисунок 2. Количество клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом, Me(Q₁-Q₃)

Известно, что одной из причин возникновения пор в мембране митохондрий является дисбаланс белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2 [Garcia-Saez A.J., 2010]. В этой связи на втором этапе исследования нами оценивалось влияние проапоптотических концентраций доноров внутриклеточных газовых транмиттеров на систему белков семейства Bcl-2 в опухолево-трансформированных лимфоцитах. Антиапоптотическая активность Bcl-2 основана на его способности непосредственно связывать цитохром c и вытеснять его из апоптосомы, предотвращая тем самым

активацию каспаз [Garcia-Saez A.J., 2010]. Проведенный нами вестерн-блот анализ показал, что уровень белка Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия на них SNP в концентрации 100 мМ достоверно увеличивался (рисунок 3).

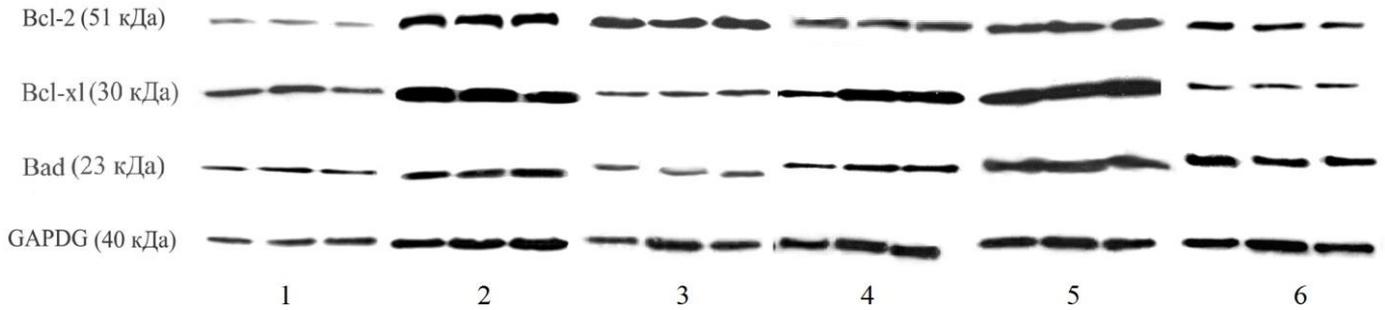


Рисунок 3. Оценка внутриклеточного содержания белков семейства Bcl-2

При 15-ти минутной инкубации Т-лимфобластных лейкоцитов со 100 мМ SNP отмечалось снижение уровня экспрессии гена *bcl-2* (рисунок 4А). Содержание белка Bcl-2 при воздействии NOC-5 в концентрации 100 мкМ на клетки линии Jurkat в течение 24 ч не изменялось по сравнению с интактной культурой (рисунок 4А), однако экспрессия кодирующего его гена снижалась.

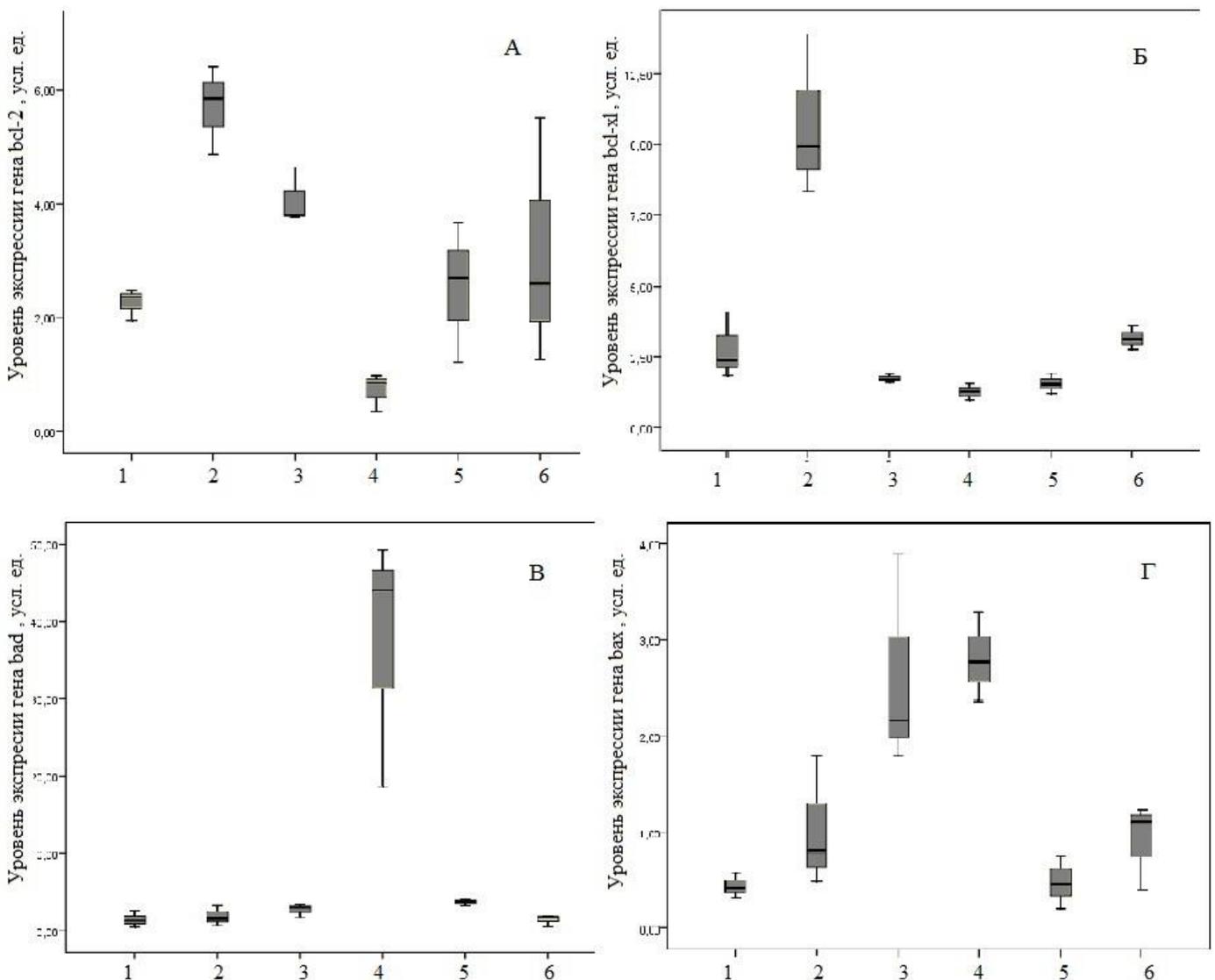


Рисунок 4. Экспрессия генов белков семейства Bcl-2, Me(Q₁-Q₃)

Подытоживая данные литературы и собственные результаты, можно предположить, что действие доноров оксида азота в проапоптотической концентрации вызывает снижение транскрипции гена *bcl-2* вследствие S-нитрозилирования транскрипционного фактора CREBBP. В ответ на угнетение транскрипции гена *bcl-2* происходит замедление деградации соответствующего протеина. В литературе имеются данные демонстрирующие, что S-нитрозилирование самого белка Bcl-2 предотвращает его деградацию через убиквитин-протеасомальный путь [Azad N. et al., 2006].

Было показано, что уровень белка Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия на них NaHS в концентрации 10 mM увеличивается, а CORM-2 в концентрации 50 мкМ – снижается (рисунок 3).

Однако при действии NaHS в концентрации 10 mM отмечалось снижение уровня экспрессии мРНК гена Bcl-2 относительно значения, полученного в интактной культуре, а повышение внутриклеточной концентрации монооксида углерода не вызывало изменения экспрессии гена *bcl-2* (рисунок 4А). Известно, что H₂S в физиологических концентрациях способен приводить к фосфорилированию и ингибированию белка Bad, а также повышению экспрессии Bcl-2 и Bcl-xL. Однако другие исследователи показали, что H₂S-индуцированный апоптоз сопровождается повышением экспрессии p53, ku 70, ku 80, Вах и цитохрома *c*, но не Bcl-2 [Yang G.D., Wang R., 2007]. В нашем исследовании в бласттрансформированных клетках сульфид водорода являлся негативным регулятором экспрессии гена Bcl-2, что еще раз подтверждает его дуалистический эффект, зависящий от дозы и типа клеток.

Имеются данные, что другой антиапоптотический белок Bcl-XL способен блокировать образование апоптосомы, связываясь с Araf-1 и каспазой-9, образуя тройной комплекс [Bertini I., 2011]. Воздействие NOC-5, SNP, NaHS и CORM-2 на интактные клетки линии Jurkat сопровождалось достоверным снижением экспрессии мРНК гена *bcl-xl*, по сравнению с контролем (рисунок 4Б). Измерение содержания соответствующего белка в клетках линии Jurkat методом вестерн-блоттинга показало, что воздействие оксида азота в обеих концентрациях и сульфида водорода не влияет на уровень белка Bcl-xL (рисунок 3). Таким образом, снижение экспрессии гена *bcl-xl* не приводит к снижению содержания соответствующего протеина, что, возможно, вызвано высвобождением Bcl-xL из связи с другими протеинами либо переходом в активную форму. Воздействие донора монооксида углерода в концентрации 50 мкМ на клетки линии Jurkat приводило к снижению содержания изучаемого белка, что может являться следствием подавления экспрессии соответствующего гена.

Важным участником в регуляции митохондриального пути апоптоза является белок Bad. Известно, что указанный протеин способен гетеродимеризоваться с Bcl-xl или Bcl-2, нейтрализуя их протективный эффект и промотируя смерть клетки [Borner C., 2003]. Нами было показано, что высокая концентрация оксида азота (100 mM) и сульфид водорода (10 mM) не являлись регуляторами экспрессии гена *bad* в клетках линии Jurkat. NO в низкой концентрации (100 мкМ) являлся позитивным регулятором экспрессии гена *bad*, а монооксид углерода (50 мкМ) – негативным (рисунок 4В). Оценка внутриклеточного содержания белка Bad показала, что доноры оксида азота (100 мкМ NOC-5), сульфида водорода и монооксида углерода повышали содержание белка Bad в клетках линии Jurkat (рисунок 3). Донор оксида азота (100 mM SNP) на изучаемый параметр не влиял.

О влиянии газовых трансмиттеров на экспрессию гена *bax* на сегодняшний день накоплено небольшое количество противоречивых сведений. Нами была продемонстрирована NO-опосредованная сверхэкспрессия гена *bax*. Кроме того, было показано, что донор сульфида водорода является негативным регулятором экспрессии гена *bax*. Экспрессия гена *bax* не изменялась при повышении внутриклеточной концентрации монооксида углерода (рисунок 4Г).

Классическими специфическими рецепторами, индуцирующими апоптоз, является суперсемейство TNF-рецепторов [Ярилин А.А., 2005]. 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 [Garg A.K., Aggarwal B.B., 2002]. Присоединение к рецептору соответствующего лиганда индуцирует ассоциацию специфических смертельных доменов рецептора и их взаимодействие с адаптерными протеинами, имеющими в своей структуре домены, способные соединяться с аналогичными участками в структуре прокаспазы-8 [Marsden V.S., 2002]. Проведенное нами исследование выявило увеличение числа TNFR1-презентирующих клеток в случае воздействия SNP в проапоптотической дозе на клеточную линию Jurkat (табл. 2).

Таблица 2

Содержание TNF α в супернатантах культур и содержание TNFR1–презентирующих клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов в условиях воздействия доноров газовых трансмиттеров, (Me(Q₁-Q₃))

	Количество TNFR1–положительных клеток, %	Уровень продукции TNF α , пг/мл
Мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров	2,01 (0,91–3,04)	885,4 (707,9-995,4)
Интактные клетки линии Jurkat	2,00 (1,35-2,45) $p_1 > 0,05$	11,7 (10,8-12,4) $p_1 < 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 100 мМ SNP	17,93 (14,30-24,20) $p_2 < 0,05$	4,2 (3,5-4,9) $p_2 < 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 100 мкМ NOC-5	1,53 (1,35-1,75) $p_2 > 0,05$	11,5 (11,2-11,8) $p_2 > 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 10 мМ NaHS	3,90 (2,30-4,95) $p_2 > 0,05$	3,1 (1,8-4,3) $p_2 < 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 50 мМ CORM-2	88,73 (85,10-93,45) $p_2 < 0,05$	10,50 (10,10-10,90) $p_2 > 0,05$

Примечание: p_1 - достоверность различий по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров; p_2 - достоверность различий по сравнению с интактной культурой линии Jurkat

Полученные данные позволяют предположить, что изменения внутриклеточного содержания оксида азота приводят к повышению готовности клеток к запуску апоптотической программы по рецепторному пути. Однако инкубирование интактных клеток линии Jurkat с NOC-5 в концентрации 100 мкМ не

вызывало достоверных изменений изучаемого параметра по сравнению с контролем. Следовательно, эффект оксид азота на презентацию опухолевыми клетками TNFR1 является дозозависимым. Сульфид водорода на экспрессию клетками линии Jurkat рецепторов к TNF α не влиял. Воздействие монооксида углерода приводило к повышению значений параметра (табл. 2).

Вместе с тем наличие специфического рецептора на клеточной мембране не позволяет судить о том, инициируется ли апоптоз по рецепторному пути или нет. Для ответа на этот вопрос было необходимо зафиксировать присутствие в среде соответствующего лиганда – TNF α , запускающего внутриклеточный каскад, приводящий к активации каспаз. В проведенных нами исследованиях анализ уровня продукции TNF- α показал, что величина этого показателя *in vitro* снижалась при действии оксида азота (100 мМ) и сульфида водорода. Действие оксида азота (100 мкМ) и монооксида углерода на продукцию TNF- α влияния не оказывало (табл. 2).

Влияние внутриклеточных газовых трансммиттеров на экспрессию белков-ингибиторов каспаз и активность каспаз-9 и -3

Контрольной точкой в определении судьбы клетки является также действие белков, подавляющих конечные этапы апоптоза. Известны белки, ингибирующие каспазу-8 (FLICE-протеазу), семейство белков IAP (апоптоз-ингибирующие белки), а также открытый сравнительно недавно белок Aven. Добавление доноров оксида азота (SNP и NOC-5) к клеткам линии Jurkat приводило к статистически значимому снижению уровня мРНК гена χ IAP, однако, содержание белка было достоверно выше, чем в интактной культуре (рисунок 5А,В).

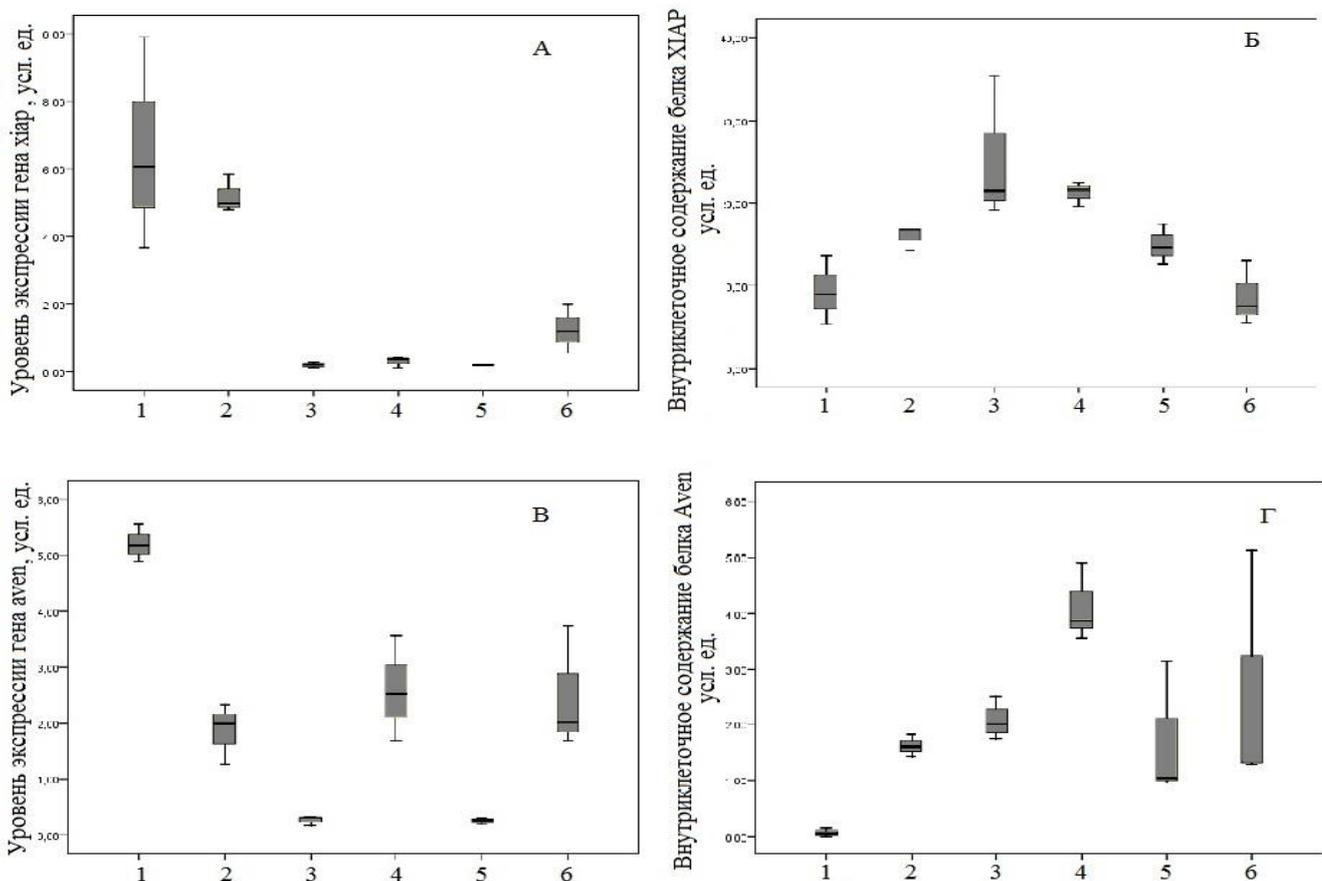


Рисунок 5. Экспрессия генов белков-ингибиторов каспаз и их внутриклеточное содержание, Me(Q₁-Q₃)

Полученные нами результаты показывают, что при воздействии проапоптотических доз указанных доноров содержание белка xIAP повышалось. Идентичные эффекты по изменению экспрессии гена *xIAP* были обнаружены при культивировании клеток линии Jurkat с донором сульфида водорода. При воздействии NaHS в концентрации 10 мМ экспрессия гена *xIAP* снижалась, однако содержание белка xIAP при этом не изменялось (рисунок 5А,В). По всей видимости, сульфид водорода, в отличие от оксида азота, не обладает стабилизирующим действием на мРНК, и таким образом содержание белка xIAP не изменяется. Культивирование клеток линии Jurkat в среде, содержащей проапоптотическую дозу донора монооксида углерода, приводило к снижению экспрессии гена *xIAP* относительно интактной культуры, содержание исследуемого белка при этом снижалось (рисунок 5А,В).

Полученные данные указывают на то, что одним из механизмов, с помощью которого монооксид углерода вызывает апоптоз опухолевых клеток линии Jurkat, является подавление экспрессии гена кодирующего белок xIAP. Однако при этом нами было зафиксировано увеличение содержания белка xIAP (рисунок 5А,В).

Нами было изучено влияние внутриклеточных газовых транмиттеров на экспрессию гена *aven* и содержание соответствующего протеина в клетках линии Jurkat. Было показано, что SNP способен регулировать только транскрипцию гена *aven*, не оказывая влияния на трансляцию соответствующего белка. Другой донор оксида азота – NOC-5 – участвовал в регуляции экспрессии белка Aven, при этом, не оказывая влияния на экспрессию соответствующего гена (рисунок 5Б,Г).

Действие донора сульфида водорода подавляло экспрессию гена Aven; при этом изменения содержания соответствующего белка не происходило. Возможно, сульфид водорода подавляет экспрессию гена благодаря способности S-сульфгидрировать цистеиновые остатки аминокислот, в том числе и в транскрипционных факторах; в ответ на подавление экспрессии включаются компенсаторные механизмы, к числу которых относится защита белка от деградации, что позволяет поддерживать уровень белка в клетке. Полученные в нашем исследовании данные свидетельствуют о том, что повышение внутриклеточной концентрации монооксида углерода не приводит к изменению экспрессии гена Aven; на содержание соответствующего протеина монооксид углерода также не влияет (рисунок 5Б,Г). По всей видимости, Aven не является мишенью действия монооксида углерода.

Для того, чтобы комплексно оценить влияние доноров оксида азота, сульфида водорода и монооксида углерода на апоптоз нормальных и опухолевых клеток крови нами была проведена спектрофотометрическая оценка активности каспазы-3 и каспазы-9. Зафиксированное нами повышение активности каспазы-3 являлось причиной увеличения количества апоптотически-измененных клеток при действии всех трех газов. Каспаза-3 может активироваться за счет ферментативного расщепления инициаторной каспазой-9; последняя активируется митохондриальными апоптоз-индуцирующими факторами. Нами было показано, что проницаемость митохондриальных мембран увеличивалась в 68 раз при действии SNP, в 73 раз - при действии NOC-5, в 15 раз - при действии донора монооксида углерода и в 8 раз - при повышении внутриклеточной концентрации сульфида водорода. При этом SNP, NaHS и CORM-2 повышали активность каспазы-9 в одинаковой степени; NOC-5 не влиял

на активность данного фермента. Зафиксированное нами многократное повышение проницаемости митохондриальной мембраны в случае воздействия NO, а как следствие выход апоптоз-индуцирующих факторов, должно приводить к более выраженной активации каспазы-9 и -3, чего выявлено не было. Нами было показано, что H₂S и CO вызывают появление одинакового количества апоптотически-измененных клеток. Уровень активности каспазы-3 и -9 при инкубации клеток с донорами данных газов также не различался. При этом количество клеток со сниженным Δψ в случае действия CO в 2 раза превышало таковое при воздействии на клетки H₂S. Отсутствие ожидаемого эффекта от воздействия апоптоз-индуцирующих факторов на каспазу-9 при инкубации клеток с донором CO может быть следствием CO-опосредованного повышения содержания белка ингибитора каспаз xIAP.

Вклад p38 MAPK в молекулярные механизмы апоптогенного действия внутриклеточных газовых трансммиттеров

Нами была определена роль p38 MAPK-зависимых путей в апоптогенном действии газовых трансммиттеров. Механизмы сигнальной трансдукции в своем большинстве основаны на посттрансляционной модификации белков-мишеней, среди которых фосфорилирование играет главную роль. Эукариотическая клетка содержит широкий спектр киназ (518 в клетках человека), многие из которых плохо изучены, но на основе имеющихся знаний известно, что киназы, в частности p38, входящие в семейство MAPK (митоген-активированные протеинкиназы), участвуют в большинстве путей передачи сигнала. Пиридинил-имидазольные препараты, такие как используемый нами ингибитор SB203580, были первыми идентифицированными ингибиторами p38 MAPK, способными конкурентно связываться с АТФ-связывающим доменом киназы. В низких концентрациях данные соединения ингибируют p38α и p38β, но не p38γ и p38δ [Cuadrado A., Nebreda A.R., 2010]. Нами впервые была показана вовлеченность p38 MAP киназы в трансдукцию проапоптотического сигнала внутриклеточных газовых трансммиттеров. В проведенном исследовании продемонстрировано снижение количества клеток, вступивших в апоптоз при культивировании клеточной линии Jurkat с выключенными p38 MAPK-зависимыми сигнальными путями с SNP, NOC-5 и NaHS по сравнению с культурой клеток, обработанных только SNP, NOC-5 и NaHS (рисунок 6). Возможно, такая реакция объясняется, тем, что оксид азота вызывает окислительный стресс посредством образующихся активных форм азота, а сульфид водорода в используемой концентрации является сильным восстановителем, что приводит к активации p38 MAPK, являющейся стресс-активируемой киназой, через которую сигнал передается нижележащим мишеням. Кроме того, известно, что p38 MAPK опосредует Вах-индуцированную пермеабиллизацию митохондриальной мембраны и апоптоз в нейронах [Gomez-Lazaro M. et al., 2007]. Можно предположить, что ингибирование указанной киназы препятствует пермеабиллизации мембраны и снижению трансмембранного митохондриального потенциала.

Однако не всегда p38 MAPK демонстрировала проапоптотическое действие. При ингибировании p38-зависимых путей и воздействии CORM-2 в концентрации 50 мкМ мы отмечали увеличение числа апоптотических клеток линии Jurkat по сравнению с клеточной культурой, инкубированной только с CORM-2, что

доказывает антиапоптотические свойства р38 в данных условиях. Кроме того, аналогичные условия культивирования приводили к увеличению количества клеток линии Jurkat со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом, в то время как эффект других газов от активности р38 MAP киназы не зависел (рисунок 6).

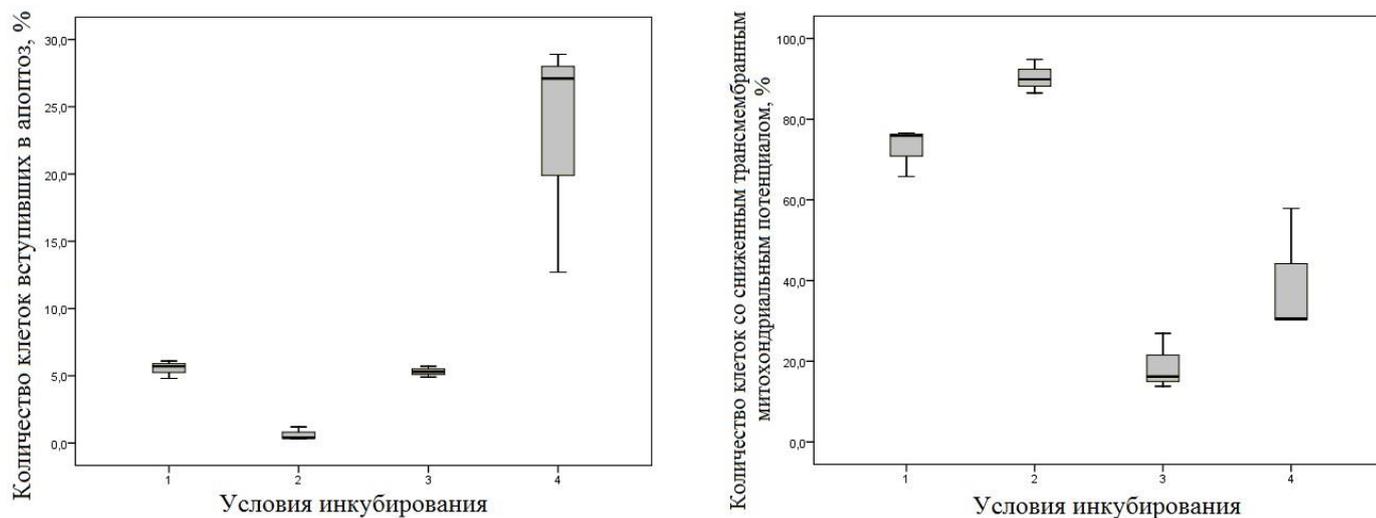


Рисунок 6. Количество клеток вступивших в апоптоз, Me(Q₁-Q₃). Условия инкубации: 1 – клетки линии Jurkat при действии SNP в дозе 100 мМ и 0,2 мкМ SB 203580; 4 – клетки линии Jurkat при действии NOC-5 в дозе 100 мкМ и 0,2 мкМ SB 203580; 5 – клетки линии Jurkat при действии NaHS в дозе 10 мМ и 0,2 мкМ SB 203580; 6 – клетки линии Jurkat при действии CORM-2 в дозе 50 мкМ и 0,2 мкМ SB 203580.

Нами было показано, что донор оксида азота (SNP в дозе 100 мМ) являлся негативным р38-зависимым регулятором экспрессии генов *bcl-2*, *bcl-x1*, *xiap*, *aven*, позитивным р38-зависимым регулятором экспрессии гена *bax*. Полученные данные подтверждают предположение о том, что высокая концентрация оксида азота является стрессовой для клетки, вызывая цепь реакций (повышение экспрессии про- и угнетение экспрессии антиапоптотических генов), являющихся р38 MAPK-зависимыми.

Кроме того, донор оксида азота (SNP в дозе 100 мМ) являлся позитивным р38-зависимым регулятором содержания белков *Bcl-2* и *xIAP*. Известно, что эффект NO на стабильность белка *Bcl-2* проявляется только при дефосфорилированном состоянии последнего [Azad N. et al., 2006]. Ингибирование р38 MAPK приводит к изменению статуса фосфорилирования *Bcl-2* и снижению стабилизирующего эффекта оксида азота на белок. Данные результаты демонстрируют вовлеченность р38 MAPK в трансдукцию сигнала от оксида азота к *Bcl-2*. S. Wang [2008] в эксперименте с клеточной линией THP-1 показал, что NO способен стабилизировать мРНК большого числа генов через механизмы, которые частично зависят от активации MAPK р38. Возможно, именно с этим связано повышение содержания белка *xIAP* на фоне угнетения транскрипции соответствующего гена.

Действие донора оксида азота (100 мкМ NOC-5) затрагивало иные сигнальные пути, отличные от р38 MAPK. Доказательством этого служат полученные нами данные о том, что NOC-5 являлся негативным р38-независимым регулятором экспрессии генов *bcl-2* и *bcl-x1*, а также позитивным р38-независимым регулятором экспрессии генов *bad*, *bax*. Однако р38-независимым являлось только NOC-5-

опосредованное повышение содержания белка Bad, содержание белков Bcl-2, Aven и xIAP регулируется p38 MAPK. Вероятно, оксид азота регулирует транскрипцию и трансляцию через разные сигнальные пути.

Сульфид водорода являлся негативным p38-зависимым регулятором экспрессии генов *bax*, *bcl-xl* и *aven*. Интересно отметить, что сигнальные пути и эффекты сульфида водорода на экспрессию генов и содержание соответствующих белков в некоторых случаях отличались. Так, сульфид водорода являлся позитивным p38-зависимым регулятором содержания белков Bcl-2 и Bad.

Монооксид углерода являлся негативным p38-зависимым регулятором экспрессии генов *bcl-2*, *bad*, *bcl-xl* и *xiap*. Следовательно, монооксид углерода опосредует свое влияние на экспрессию генов через активацию p38. Следствием подавления экспрессии генов может являться снижение содержания соответствующих белков в клетке, что и было зарегистрировано нами. Монооксид углерода являлся негативным p38-зависимым регулятором содержания белков Aven, xIAP, Bcl-2 и Bcl-xl, позитивным p38-зависимым регулятором содержания белка Bad. Помимо этого, нами было показано, что сама p38 киназа являлась негативным регулятором содержания белка Bad.

Оценка вовлеченности p38 MAPK в модуляцию рецепторного пути посредством внутриклеточных газовых транмиттеров показала, что увеличение числа TNFR1-презентирующих клеток в случае воздействия SNP в проапоптотической дозе от активности p38 MAP киназы не зависит. Воздействие на клетки NOC-5 не отражалось на уровне TNFR1-презентирующих клеток. Донор сульфида водорода на экспрессию клетками линии Jurkat рецепторов TNF α к также не влиял, однако его воздействие на фоне заблокированной p38 MAPK приводило к резкому увеличению количества клеток несущих данный рецептор до 90%, что позволяет предполагать наличие антиапоптотических свойств у указанной киназы. Донор монооксида углерода повышал значения изучаемого параметра, при этом его эффект лишь частично являлся p38 MAPK-зависимым. Продукция TNF α клетками линии Jurkat на фоне изменения внутриклеточной концентрации газовых транмиттеров от статуса p38 MAPK не зависела.

Интересные данные были получены при изучении вовлеченности p38 MAPK в изменение активности каспаз посредством газовых транмиттеров. Нами было показано, что оба донора оксида азота опосредовали свое влияние на активность каспазы-9 и -3 через p38 MAPK. Активность каспазы-3 повышалась при воздействии сульфида водорода на фоне ингибирования p38 киназы, что показывает антиапоптотические свойства последней. Эффект на каспазу-9 являлся p38 MAPK-зависимым.

Заключение

Проведенное нами исследование показало, что общими закономерностями проапоптотического действия всех трех включенных в исследование газов являются снижение митохондриального трансмембранного потенциала и активация каспазы-3 (рисунок 7). Однако, причины указанных событий при действии газов разные. Так, оксид азота в концентрации 100 мкМ изменяет экспрессию генов *bcl-2*, *bcl-xl*, *bad* и *bax*, и повышает содержание протеина Bcl-2 и Bad. Оксид азота в концентрации 100 мМ и сульфид водорода также изменяют экспрессию генов *bcl-2*, *bcl-xl*, *bad* и *bax*, но

указанные изменения отражаются только на содержании белка Bcl-2 (увеличивается). В случае H_2S повышение содержания Bcl-2 может нивелироваться за счет зафиксированного увеличения количества проапоптотического белка Bad. Оксид азота (100 мМ) и сульфид водорода опосредуют свое действие вовлечением p38 MAPK. Монооксид углерода приводит к дисбалансу белков семейства Bcl-2: повышению содержания проапоптотического белка Bad и снижению содержания антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL. Кроме того, действие CO сопровождается снижением содержания белка-ингибитора каспаз – xIAP, что также вносит вклад в повышение активности каспаз-3 и -9.

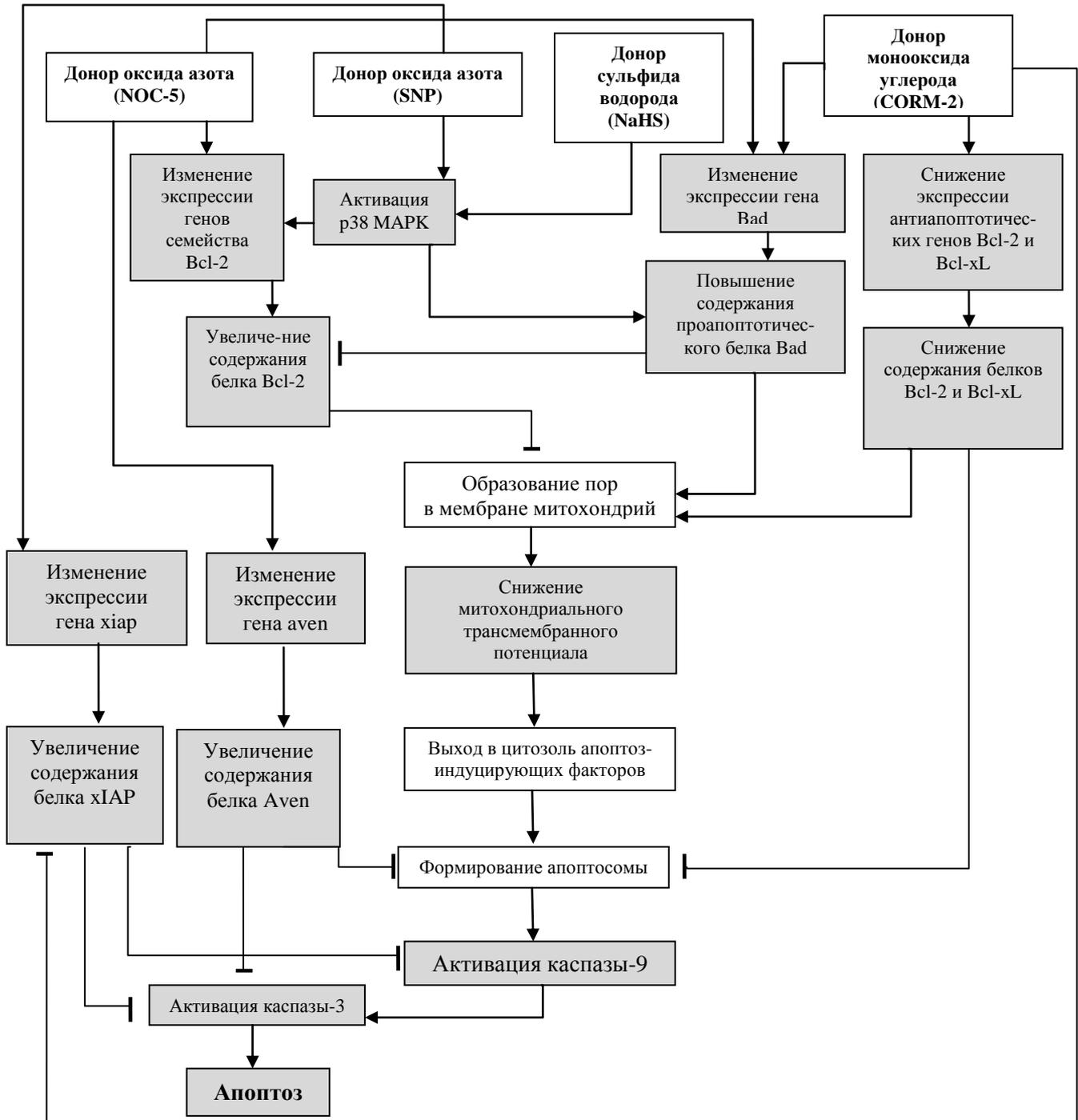


Рисунок 7. Механизмы развития апоптоза при действии внутриклеточных газовых транмиттеров в опухолевых клетках линии Jurkat [по данным S. Elmore (2007) и результатам собственных исследований (выделено серым цветом)]

ВЫВОДЫ

1. Особенности влияния доноров внутриклеточных газовых транмиттеров (SNP, NOC-5, NaHS и CORM-2) на реализацию апоптоза клеток крови *in vitro* определяются специфичностью в отношении клеточной культуры и временем воздействия на клетки (SNP в дозе 100 мМ и NaHS в дозе 10мМ 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 повышают количество апоптотически измененных клеток опухолевой линии Jurkat и не оказывают данного эффекта на мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров), а также носят дозозависимый характер.

2. Общим механизмом проапоптотического действия доноров NO, H₂S и CO на лейкоэмические Т-лимфобласты является повышение количества клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом и повышение активности каспазы-3.

3. Действие доноров оксида азота (SNP и NOC-5) сопровождается внутриклеточным p38 MAPK-зависимым повышением содержания белка-ингибитора каспаз xIAP. Донор монооксида углерода (CORM-2) p38-опосредованно подавляет экспрессию гена xiap, что приводит к снижению содержания соответствующего протеина и активации каспазы-9.

4. Действие на клетки донора оксида азота (SNP) приводит к увеличению содержания белка Bcl-2 на фоне снижения экспрессии соответствующего гена; влияние доноров оксида азота (SNP и NOC-5) обуславливает NO-опосредованную сверхэкспрессию гена bax; действие *in vitro* сульфида водорода (NaHS) сопровождается увеличением содержания белков Bcl-2 и Bad. Действие на клетки донора монооксида углерода (CORM-2) вызывает снижение содержания антиапоптотических протеинов Bcl-2 и Bcl-xL, повышение содержания белка Bad.

5. Действие доноров газовых транмиттеров (SNP и CORM-2) на клетки линии Jurkat *in vitro* приводит к повышению готовности клеток к запуску апоптоза через TNFR1 на фоне снижения TNF α (для SNP). Донор NOC-5 не оказывает влияния на систему TNF α -TNFR1 в опухолевых клетках.

6. Реализация проапоптотического эффекта доноров внутриклеточных газовых транмиттеров оксида азота, сульфида водорода и монооксида углерода в клетках опухолевой линии Jurkat сопряжена с участием p38 MAPK.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. The role of transcriptional factors P53 and NF-KB in the induction of apoptosis during the oxidative stress *in vitro* / L.A. Kleptsova (L.A. Tashireva), I.S. Losenkov, E.G. Starikova, E.V. Kaigorodova, M.V. Belkina // Материалы V международной (XIV всероссийской) пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, Москва, РГМУ, 2010. – Москва, 2010. – С. 436.
2. Molecular mechanisms of the oxidative stress effect on BCL-2 family proteins / I.S. Losenkov, L.A. Kleptsova (L.A. Tashireva), E.G. Starikova, E.V. Kaigorodova, A.N. Maroshkina // Материалы V международной (XIV всероссийской) пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, Москва, РГМУ, 2010. – Москва, 2010. –С. 437.
3. Изменения реализации апоптотической программы трансформированных клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров при воздействии

- сульфида водорода / Л.А. Клепцова (Л.А. Таширева), Е.Г. Старикова, Ю.В. Стариков, Е.В. Кайгородова // Сибирский онкологический журнал. – 2010. Приложение № 1. – с. 58-59.
4. Влияние сульфида водорода на реализацию апоптотической программы опухолевых клеток / Старикова Е.Г., Клепцова Л.А. (Таширева Л.А.), Кайгородова Е.В. // Материалы XV межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» 21-22 апреля 2010 года, г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2010. – С. 160 – 161.
 5. The role of hydrogen sulphide in apoptosis induction / Starikova E., Kleptsova L. (Tashireva L.), Jakushina V., Novitsky V., Ryazantseva N. // The 6th International Congress of Pathophysiology «Gene-environment interaction in health and disease», Montreal, 22-25 September, 2010. - Montreal, 2010. - P.70-71.
 6. Роль р38-зависимого пути в реализации апоптоза клеток линии Jurkat в условиях модуляции внутриклеточной газовой коммуникации / Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Осихов И.А., Калининкова Ю.Г. // Материалы XVI межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» 20-21 апреля 2011 года, г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2011. – С. 154 – 156.
 7. Экспрессия генов *h1ar* и *aven* при воздействии доноров сульфида водорода и оксида азота на клетки линии Jurkat / Таширева Л.А., Старикова Е.Г., Самалова Н.А., Ермишова А.В. // Материалы XVI межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» 20-21 апреля 2011 года, г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2011. – С. 162 – 164.
 8. Трансдукция апоптотического сигнала с участием монооксида углерода и сульфида водорода в клетках линии Jurkat / Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Рязанцева Н.В., Стариков Ю.В., Новицкий В.В. // Сборник статей второй международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», 26–28.10.2011, Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2011. – С. 150 – 152.
 9. Регуляция апоптоза клеток с использованием газовых трансммиттеров (оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода) / Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Старикова Е.Г., Таширева Л.А. // Вестник науки Сибири. – 2011. – № 1 (1). – С. 635-640.
 10. Роль сульфида водорода в регуляции апоптоза клеток / Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Старикова Е.Г., Клепцова Л.А. (Таширева Л.А.), Якушина В.Д., Кайгородова Е.В. // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2011. – Т. 151. № 6. – С. 646-649.
 11. Роль внутриклеточных газовых трансммиттеров сульфида водорода и оксида азота в регуляции апоптоза нормальных и бласттрансформированных клеток / Старикова Е.Г., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Таширева Л.А. и др. // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2011. – Т. 10. № 6. – С. 40-44.
 12. Внутриклеточные газовые посредники оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода участвуют в регуляции апоптоза / Рязанцева Н.В., Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Степовая Е.А., Стариков Ю.В., Осихов И.А., Новицкий В.В. // **Цитология**. – 2012. – Т. 54. № 2. – С. 105-111.
 13. Монооксид углерода: роль в митохондриальном пути запуска апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat / Таширева Л.А., Бельдягина Е.В., Васильева О.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Старикова Е.Г. // **Медицинская иммунология**. – 2012. – Т. 14. № 4-5. – С. 353-359.
 14. Идентификация чувствительных к воздействию монооксида углерода молекулярных мишеней, ответственных за регуляцию G1 фазы клеточного цикла / Старикова Е.Г.,

- Таширева Л.А., Бельдягина Е.В., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. // **Сибирский онкологический журнал**. – 2012. – № 4. – С. 48-51.
15. Роль TNF-рецепторного пути реализации апоптоза в клетках линии Jurkat с участием газовых трансмиттеров / Таширева Л.А., Старикова Е.Г., Прохоренко Т.С., Васильева О.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. // **Цитокины и воспаление**. – 2012. – Т. 11. № 4. – С. 30-33.
 16. Оксид азота и сульфид водорода как р38-зависимые регуляторы экспрессии генов *xIAP* и *Aven* в опухолевых клетках линии Jurkat / Таширева Л.А., Старикова Е.Г., Новицкий В.В., Васильева О.А., Якушина В.Д., Степовая Е.А., Бельдягина Е.В., Зима А.П., Прохоренко Т.С., Осихов И.А., Саприна Т.В., Носарева О.Л., Коновалова Е.В., Кайгородова Е.В., Рязанцева Н.В. // **Сибирский онкологический журнал**. – 2012. – № 5 (53). – С. 23-27.
 17. Внутриклеточные мишени проапоптотического влияния газовых трансмиттеров / Таширева Л.А., Старикова Е.Г., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. // **Вестник Российской академии медицинских наук**. – 2012. – № 10. – С. 77-81.
 18. Участие редокс-сигнализации в опосредованной оксидом азота, монооксидом углерода и сульфидом водорода регуляции апоптоза и клеточного цикла / Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Васильева О.А., Якушина В.Д., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2013. – Т. 12. № 1. – С. 49-54.
 19. Молекулярные механизмы регуляторного влияния сульфида водорода на прогрессию фаз клеточного цикла / Новицкий В.В., Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Рязанцева Н.В. // **Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук**. – 2013. – Т. 33. № 2. – С. 5-9.
 20. Участие р38 MAPK в апоптотическом уменьшении объема Jurkat клеток, обработанных газотрансмиттерами / Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2013. – Т. 12. № 4. – С. 81.
 21. Средство и способ индукции апоптоза опухолевых клеток / Старикова Е.Г., Васильева О.А., Таширева Л.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. // RU 2488408, от 27.07.2013.
 22. P38 MAPK-dependent targets of gaseous transmitters proapoptotic action in Jurkat cells / Starikova Ye.G., Tashireva L.A., Novitsky V.V., Ryazantseva N.V. // *American Journal of cancer science* – 2013. – Vol.2 – P. 1-12.
 23. Nitric oxide donor NOC-5 increases XIAP and Aven level in Jurkat cells / Starikova Ye.G., Tashireva L.A., Novitsky V.V., Ryazantseva N.V. // **Cell Biology International**. – 2014. – doi: 10.1002/cbin.10262.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода
 мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 Bad – Bcl-2-ассоциированный промотер смерти
 Bax – Bcl-2-ассоциированный X белок
 Bcl-2 – белок В-клеточной лимфомы 2
 Bcl-xL – Bcl-2-подобный белок, длинная изоформа
 CORM – CO-высвобождающая молекула
 HO – гемоксигеназа
 IL – интерлейкин
 JNK – c-Jun N-терминальная киназа
 LPS – липополисахарид
 NF-κB – ядерный фактор «каппа-би»

MAPK - митоген-активируемые протеинкиназы
 NOS – NO-синтаза
 TNFα – фактор некроза опухоли α
 TNFR1 – рецептор фактора некроза опухоли I типа
 TRADD – TNFR1- ассоциированный белок домена смерти
 VDAC – порин-вольтаж зависимый канал
 Δψ – митохондриальный трансмембранный потенциал