

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

На правах рукописи

Таширева Любовь Александровна

**Роль внутриклеточных газовых транзиттеров  
в молекулярных механизмах реализации апоптоза  
опухолевых клеток крови**

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

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

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

Томск – 2014

## Оглавление

Введение		6
<b>Глава 1.</b>	<b>Обзор литературы</b>	<b>13</b>
1.1.	Газовые трансмиттеры как регуляторы клеточных функций	13
1.1.1.	Оксид азота: физико-химические свойства, продукция и эффекты в организме	14
1.1.2.	Сульфид водорода: физико-химические свойства, продукция и эффекты в организме	18
1.1.3.	Монооксид углерода: физико-химические свойства, продукция и эффекты в организме	21
1.1.4.	Внутриклеточные газы – регуляторы апоптоза	26
1.2.	Молекулярные механизмы апоптоза	32
1.2.1.	МАРК (митоген-активируемые протеинкиназы) каскады в трансдукции сигнала апоптоза	34
1.2.2.	Белки – регуляторы апоптотического процесса	38
1.2.3.	Нарушения апоптоза и внутриклеточной газовой коммуникации при опухолевом росте	42
	Заключение	45
<b>Глава 2.</b>	<b>Материал и методы исследования</b>	<b>48</b>
2.1.	Материал исследования	48
2.1.1	Экспериментальный блок исследования	49
2.2.	Методы исследования	52
2.2.1.	Культивирование клеточной линии Jurkat in vitro	54
2.2.2.	Выделение и культивирование мононуклеарных лейкоцитов крови	54
2.2.3.	Оценка количества апоптотически и некротически измененных клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов крови с использованием метода проточной лазерной цитофлуориметрии	55
2.2.4.	Оценка митохондриального трансмембранного потенциала мононуклеарных лейкоцитов крови	56
2.2.5.	Оценка количества TNFR1-позитивных клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов крови	57
2.2.6.	Оценка продукции TNF- $\alpha$ клетками линии Jurkat и мононуклеарными лейкоцитами крови	58
2.2.7.	Оценка уровня мРНК генов белков-ингибиторов каспаз и белков-регуляторов апоптоза в клетках линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах крови	59
2.2.8.	Спектрофотометрическое определение активности каспаз-3 и -9 в клетках линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах крови	64
2.2.9.	Оценка уровня белков-ингибиторов каспаз и	64

2.2.10.	белков-регуляторов апоптоза в клетках линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах крови Статистический анализ результатов	66
<b>Глава 3.</b>	<b>Результаты собственных исследований</b>	<b>67</b>
3.1	Особенности реализации программированной гибели клеток в условиях изменения внутриклеточной концентрации оксида азота	67
3.1.1.	Определение дозы и времени воздействия доноров оксида азота, индуцирующих модуляцию апоптоза клеток	67
3.1.2.	Закономерности вовлеченности p38 MAPK в регуляцию апоптотической реакции клеток при изменении внутриклеточной концентрации оксида азота	73
3.1.3.	Особенности изменения митохондриального трансмембранного потенциала при модуляции внутриклеточной концентрации оксида азота и в условиях выключения p38 MAPK-зависимых механизмов	76
3.1.4.	Особенности изменения содержания белков семейства Bcl-2 при изменении внутриклеточной концентрации оксида азота и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	77
3.1.5.	Особенности экспрессии генов белков-регуляторов апоптоза при изменении внутриклеточной концентрации оксида азота и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	82
3.1.6	Особенности экспрессии генов и содержания соответствующих белков-ингибиторов каспаз при изменении внутриклеточной концентрации оксида азота и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	86
3.1.7.	Особенности активности каспаз-3 и -9 при изменении внутриклеточной концентрации оксида азота и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	91
3.1.8.	Оценка количества клеток, экспрессирующих TNFR1, и уровня TNF $\alpha$ в супернатантах культур клеток при изменении внутриклеточной концентрации оксида азота и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	92
3.2.	Особенности реализации программированной гибели клеток линии Jurkat в условиях воздействия донора сульфида водорода <i>in vitro</i>	95

3.2.1.	Определение дозы и времени воздействия донора сульфида водорода, необходимых для изменения апоптоза клеток	95
3.2.2.	Изучение вовлеченности p38 MAPK в регуляцию апоптотической реакции при изменении внутриклеточной концентрации сульфида водорода	99
3.2.3.	Особенности митохондриального трансмембранного потенциала при изменении внутриклеточной концентрации сульфида водорода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	100
3.2.4.	Оценка содержания белков-регуляторов апоптоза, функционирующих на уровне митохондрий при изменении внутриклеточной концентрации сульфида водорода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	101
3.2.5	Особенности экспрессии мРНК белков-регуляторов апоптоза, функционирующих на уровне митохондрий при изменении внутриклеточной концентрации сульфида водорода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	103
3.2.6.	Оценка экспрессии генов и содержания, кодируемых ими белков-ингибиторов каспаз при изменении внутриклеточной концентрации сульфида водорода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	105
3.2.7.	Оценка активности каспаз-3 и -9 при изменении внутриклеточной концентрации сульфида водорода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	107
3.2.8.	Оценка количества клеток, экспрессирующих TNFR1, и уровня TNF $\alpha$ в супернатантах культур клеток при изменении внутриклеточной концентрации сульфида водорода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	109
3.3.	Особенности реализации запрограммированной гибели клеток линии Jurkat в условиях воздействия донора монооксида углерода <i>in vitro</i>	110
3.3.1.	Определение дозы и времени воздействия донора монооксида углерода, способной модулировать апоптоз клеток	110
3.3.2.	Изучение вовлеченности p38 MAPK в регуляцию апоптотической реакции при изменении внутриклеточной концентрации монооксида углерода	113
3.3.3.	Особенности митохондриального трансмембранного потенциала при изменении	114

	внутриклеточной концентрации монооксида углерода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	
3.3.4.	Изменение содержания белков семейства Bcl-2 при изменении внутриклеточной концентрации монооксида углерода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	115
3.3.5.	Особенности экспрессии генов белков семейства Bcl-2 при изменении внутриклеточной концентрации монооксида углерода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	117
3.3.6.	Особенности экспрессии мРНК и содержания соответствующих белков-ингибиторов каспаз при изменении внутриклеточной концентрации монооксида углерода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	120
3.3.7.	Оценка активности каспаз-3 и -9 при изменении внутриклеточной концентрации монооксида углерода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	122
3.3.8.	Изменение количества клеток, экспрессирующих TNFR1, и уровня TNF $\alpha$ в супернатантах культур клеток при изменении внутриклеточной концентрации монооксида углерода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов	123
<b>Глава 4.</b>	<b>Обсуждение полученных результатов</b>	<b>125</b>
4.1.	Влияние внутриклеточных газовых трансммиттеров на реализацию суицидальной программы клетки	125
4.2.	Вовлеченность митохондриального и рецепторного пути в механизмы апоптогенного действия внутриклеточных газовых трансммиттеров	128
4.3.	Влияние внутриклеточных газовых трансммиттеров на экспрессию белков-ингибиторов каспаз и активность каспаз-9 и -3	142
4.4.	Вклад p38 MAPK в молекулярные механизмы апоптогенного действия внутриклеточных газовых трансммиттеров	148
	Заключение	153
	Выводы	155
	Список использованных сокращений	156
	Список использованной литературы	158

## Введение

**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 окиси азота (NO), окиси углерода (CO) и сульфида водорода (H<sub>2</sub>S). Три этих вещества составляют семейство газовых трансммиттеров, с присущими им схожими внутриклеточными эффектами [Wang R., 2002]. Они обладают противовоспалительным и вазодилататорным действием, участвуют в регуляции клеточного цикла, а также принимают участие в системе ноцицепции [Wu L., Wang R., 2005]. 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 H<sub>2</sub>S [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 мышинных фибробластов, а сульфид водорода ингибирует апоптоз изолированных нейтрофилов человека [Saligrama P.T., 2014; Adhikari Sh.,

Bhatia M., 2008; Petrache I., 2000]. Показано как активирующее, так и ингибирующее влияние газотрансмиттеров на белки семейства Bcl-2 [Fang Y.Y., 2013; Wang G., 2013; Zhang X., 2003]. Кроме того, противоречивая информация накоплена по поводу влияния газотрансмиттеров 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 [Eissmann M., 2013; Jost P.J., 2009]. Появляется всё больше данных о том, что, возможно, именно указанные протеины вовлечены в антиапоптотический механизм действия внутриклеточных газовых трансмиттеров [Majid A.S., 2013].

Таким образом, роль газовых трансмиттеров окиси азота, окиси углерода и сульфида водорода как вторичных мессенджеров в регуляции апоптоза представляет большой интерес в аспекте изучения процессов опухолевой трансформации клеток.

**Цель исследования:** установить молекулярные механизмы участия доноров газотрансмиттеров (оксида азота, сульфида водорода и монооксида углерода) в регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.

**Задачи исследования:**

1. Установить дозозависимость влияния доноров газотрансмиттеров (нитропруссид натрия (SNP), 3-(аминопропил)-1-гидрокси-3-изопропил-2-оксо-1-триазин (NOC-5), гидросульфид натрия (NaHS) и Ru(CO)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub> димер (CORM-2)) на реализацию апоптоза клеток крови (линия Jurkat и мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров) *in vitro*.

2. Определить роль доноров оксида азота, сульфида водорода и монооксида углерода в активации каспаз-3 и -9 в опухолевых клетках линии Jurkat *in vitro*.

3. Оценить уровень мРНК генов bcl-2, bcl-x1, bad, bax, xiap, aven, а также содержание кодируемых ими белков в опухолевых клетках линии Jurkat при воздействии доноров NO, H<sub>2</sub>S и CO *in vitro*.

4. Изучить влияние доноров внутриклеточных газовых трансммиттеров *in vitro* на систему TNF $\alpha$ -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.

6. Выявить общие закономерности и особенности воздействия доноров газов (оксида азота, сульфида водорода и монооксида углерода) на апоптоз опухолевых клеток линии Jurkat.

**Научная новизна.** Впервые идентифицирована роль доноров внутриклеточных газовых трансммиттеров в ключевых молекулярных механизмах реализации апоптоза опухолевых клеткок линии Jurkat. Установлено, что доноры оксида азота, сульфида водорода и монооксида углерода p38-опосредованно участвуют в снижении трансмембранного митохондриального потенциала и приводят к снижению активности каспазы-3. Выявлено, что донор оксида азота в клетках линии Jurkat вызывает гиперэкспрессию гена *bax*; подавляет экспрессию генов *bcl-2*, *bcl-xl*, *xiap* и *aven*, однако, повышает содержание белков *Bcl-2* и *Bad*. Показано, что действие донора сульфида водорода на клетки линии Jurkat сопровождается подавлением экспрессии генов *bcl-2*, *bcl-xl*, *bax*. В качестве белковой мишени H<sub>2</sub>S-опосредованной программированной клеточной гибели выступает протеин *Bad*, что сопровождается компенсаторным повышением содержания белка *Bcl-2*. Доказано, что донор монооксида углерода в клетках линии Jurkat приводит к снижению содержания антиапоптотических белков *Bcl-2* и *Bcl-xL*, что является следствием подавления экспрессии соответствующих генов; содержание белка *Bad* повышается на фоне подавления экспрессии гена.

Впервые продемонстрировано, что белки-регуляторы апоптоза *Aven* и *xIAP* являются мишенью действия оксида азота. Кроме того, показана возможность использования доноров внутриклеточных газовых трансммиттеров в качестве селективных индукторов апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.



**Теоретическая и практическая значимость.** Впервые получены знания фундаментального характера о влиянии газотрансмиттеров на молекулярные механизмы реализации апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat. Получены приоритетные данные о дозозависимости и избирательности действия газотрансмиттеров, а также о роли p38 MAP киназы в механизмах влияния газовых трансмиттеров на рецепторный путь апоптоза (TNFR1, TNF $\alpha$ ), процессы активации каспаз-3 и -9 и дисбаланса белков-регуляторов апоптоза (Bcl-2, Bcl-x<sub>l</sub>, Bad, XIAP, 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 трансмиттеров, а также патогенетически обоснованной терапии при злокачественных новообразованиях с использованием внутриклеточных газовых трансмиттеров.

**Методология и методы исследования:**

В работе использовалась клеточная линия Jurkat, полученная из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург), а также мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров. В качестве доноров внутриклеточных газовых трансмиттеров применялись нитропруссид натрия (SNP) и 3-(аминопропил)-1-гидрокси-3-изопропил-2-оксо-1-триазин (NOC-5), гидросульфид натрия (NaHS), а также Ru(CO)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub> 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- $\alpha$ , количество клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом определяли методом проточной лазерной цитофлуориметрии; экспрессию генов XIAP, Aven, bcl-2, bcl-x<sub>l</sub>, bad оценивали методом ПЦР в режиме реального

времени; определяли наличие в цитоплазме клеток белковых продуктов xIAP, AVEN, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bad методом вестерн-блоттинга, иммуноферментным анализом секрецию клетками TNF- $\alpha$ , активность каспаз-3 и -9 методом спектрофотометрического анализа. Результаты проведенного исследования подвергали статистической обработке.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Доноры газовых трансмиттеров обладают *in vitro* дозозависимостью и избирательностью действия на клетки крови (лейкозная линия Jurkat и мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров). Концентрации 100 мкМ NOC-5, 100 мМ SNP, 10 мМ NaSH и 50 мкМ CORM-2 способны вызывать апоптоз опухолевых клеток и не влияют на мононуклеарные лейкоциты, выделенные из крови здоровых доноров.

2. Общим механизмом проапоптотического действия доноров газовых трансмиттеров (в опухолевых клетках линии Jurkat) является р38-зависимое снижение трансмембранного митохондриального потенциала и повышение активности каспазы-3.

3. Проапоптотический эффект доноров газовых трансмиттеров не реализуется через TNF-рецепторный путь регуляции апоптоза; их эффекты опосредованы через 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).

Получен патент №2488408 «Средство и способ индукции апоптоза опухолевых клеток» от 27.07.2013г.

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 трансммиттеров в регуляции гомеостаза клетки» ГК № П1311 и «Разработка технологии селективного управления внутриклеточной газовой сигнализацией» ГК 14.740.11.0932).

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 177 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 40 рисунками и 22 таблицами. Библиографический указатель включает 196 источника (16 отечественных и 180 иностранных).

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Газовые трансмиттеры как регуляторы клеточных функций

Последние десятилетия были ознаменованы открытием новой группы газообразных внутриклеточных мессенджеров. К их числу относятся оксид азота (NO), монооксид углерода (CO) и сульфид водорода (H<sub>2</sub>S) [Wang R., 2002].

Идентификация окиси азота, простой неорганической молекулы, как эндотелиального фактора релаксации сосудов (EDRF) стала большой неожиданностью для научного сообщества, потому что все известные ранее гормоны, посредники и медиаторы были органическими соединениями. Показано, что NO играет важную роль в жизнедеятельности практически всех тканей [Wang R., 2002].

Вслед за оксидом азота второе газообразное неорганическое соединение - окись углерода - было признано в качестве эндогенного посредника и медиатора [Liu XM., 2002]. Последние исследования показывают, что другой "токсичный газ", сульфид водорода, также продуцируется в значительных количествах тканями млекопитающих и участвует во многих физиологических реакциях [Baumgart K., 2009]. Данный факт позволяет предположить его потенциальную роль как регулирующего посредника. Идея о том, что H<sub>2</sub>S может действовать в качестве эндогенного медиатора впервые была предложена около двадцати лет назад К. Abe и Н. Kimura, которые описали ферментативный механизм продукции H<sub>2</sub>S в головном мозге, биологические последствия его воздействия в физиологических концентрациях и его конкретные клеточные мишени [Abe K., Kimura H., 1996]. В последнее время H<sub>2</sub>S получает все большее признание как представитель растущего семейства "газотрансмиттеров" вместе с двумя открытыми ранее газами (NO и CO) [Wang R., 2012].

Газовые мессенджеры необходимы для внутри- и межклеточных коммуникаций высокой специфичности во многих, если не во всех клеточных системах. Показано, что газовые посредники функционируют

аналогично гормонам, нейротрансмиттерам и липидным медиаторам, а также обладают рядом специфических признаков:

1. Являясь жирорастворимыми газами, газотрансмиттеры не задерживаются клеточными мембранами, поэтому их депонирование в клетках для дальнейшего высвобождения невозможно.

2. Газотрансмиттеры уменьшают заряд клетки, поэтому специфический захват или активация метаболических процессов для передачи сигнала не требуются.

3. Все газотрансмиттеры являются простыми неорганическими соединениями.

Природа взаимодействия газотрансмиттеров с их рецепторами и внутриклеточными сигнальными путями, исключая NO и гуанилатциклазу, неисследована и требует детального изучения [Wang R., 2012].

### **1.1.1. Оксид азота: физико-химические свойства, метаболизм и эффекты**

Оксид азота (NO) - газообразная нейтральная двухатомная молекула (свободный радикал). Легко проникает через мембраны клеток и имеет период полураспада в биологических средах около 6 сек. Однако при низких концентрациях (меньше чем 1 мкМ) период ее полураспада увеличивается и может составлять от нескольких минут до часа [Гуревич К.Г. 2000].

Открытие в середине 80-х годов эндогенного оксида азота (NO), а именно того факта, что эта простейшая газовая молекула непрерывно продуцируется в клетках организма ферментативным путем с помощью NO-синтаз (NOS), выполняя функции одного из универсальных регуляторов-мессенджеров, явилось крупнейшим событием в области биологии и медицины конца XX века.

Оксид азота образуется из L-аргинина в присутствии кислорода под действием трех изоэнзимов синтазы NO (NOS). NOS I-типа (nNOS) – нейрональная конститутивная кальций-зависимая форма NOS, представлена

в нейронах мозга, спинных ганглиях, в нехолинергических и неадренергических нейронах периферической нервной системы [Forstermann U., Sessa W.C., 2012]. NOS II-типа (iNOS) – индуцибельная, кальций-независимая форма NOS, локализована в макрофагах, нейтрофилах, в клетках микро- и астроглии. Образование этой формы индуцируется цитокинами. NOS III-типа (eNOS) – эндотелиальная конститутивная кальций-зависимая форма NOS содержится в эндотелии сосудов и поддерживает нормальный тонус сосудистой стенки [Граник В.Г., 2004].

Существуют несколько путей утилизации оксида азота. NO способен необратимо взаимодействовать с гемоглобином [Liu V.W., 2008], супероксидным радикалом или кислородом, восстанавливаясь до нитрит- и нитрат иона [Tuteja N. et al., 2004]. Установлена способность мочевиной кислоты снижать содержание NO. Возможно участие NO в ферментативных превращениях. Так, показано, что оксид азота может использоваться в качестве субстрата для ферментов из семейства пероксидаз. Другим возможным ферментативным механизмом утилизации NO является его расходование на активацию простагландин-Н-синтазы [Forstermann U., Sessa W.C., 2012].

Оксид азота является регулятором многих физиологических процессов. NO, производимый клетками эндотелия сосудов, отвечает за вазодилатацию, предотвращает агрегацию тромбоцитов и адгезию нейтрофилов к эндотелию, участвует в различных процессах в нервной, репродуктивной и иммунной системах. NO обладает также цитотоксическими и цитостатическими свойствами. С нарушением биосинтеза и метаболизма NO связаны такие заболевания, как эссенциальная артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, первичная легочная гипертензия, бронхиальная астма, невротические расстройства, эпилепсия, нейродегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона) и др. [Проскуряков С.Я., 2000; Lee T.J., 2000; Schulz R., 2004; Сомова Л.М. 2006; Sultana R., 2006; Fang J., Nakamura T., 2007].

Кроме участия в регуляции тонуса гладких мышц сосудов, NO действует непосредственно на митохондриальное дыхание [Lee T.J., 2000]. Показано, что ингибирующее влияние NO на дыхательные ферменты митохондрий может быть одной из причин снижения потребления кислорода сердцем [Шиманская Т.В., 2007]. Установлено участие оксида азота в реализации воспалительного процесса. Показано, что цитокины Th1-пути (IFN- $\gamma$ , IL-1  $\beta$ , и TNF- $\alpha$ ) стимулируют экспрессию макрофагальной iNOS, что приводит к повышению продукции NO. Напротив, под влиянием цитокинов Th2-пути (IL-4, IL-10, и IL-13) продукция оксида азота снижается [Kuo H.P., 2000; Alam M.S., 2002].

Сигнальные пути NO многообразны. Образующийся в результате реакции оксида азота с супероксидом пероксинитрит является эффектором макрофаг-опосредованного уничтожения опухолевых клеток и бактерий. Кроме того, пероксинитрит способен разлагаться до высокотоксичного гидроксил радикала, который, наряду с другими активными формами кислорода, повреждает многие внутриклеточные органеллы.

Биологическая активность NO может быть разделена на цГМФ-зависимую и цГМФ-независимую. Оба присутствуют как в физиологических, так и патологических условиях, однако образование цГМФ является основным физиологическим путем передачи сигналов. NO активирует цГМФ-образующий фермент гуанилатциклазу, связываясь с гемовым железом в активном сайте фермента [Mustafa A.K., 2009].

цГМФ-независимые эффекты NO реализуются через пост-трансляционную модификацию белков. Исследования J.S. Stamler et al. [2005] установили, что оксид азота может S-нитрозировать многочисленные белки. Были обнаружены протеины, нитрозированные в диком типе, но не у nNOS-нокаутных мышей, такие как глицeroальдегид-3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH), гликоген фосфорилаза, креатинкиназа, белок гена ретинобластомы (Rb), белок теплового шока-72 (HSP-72), АТФаза, рецептор NMDA,  $\beta$ -тубулин и актин. Оксид азота, произведенный при участии iNOS,



нитрозилирует и активизирует COX2 (циклоксигеназу-2). Выборочное предотвращение iNOS-COX2 связывания отменяет NO-опосредованную активацию COX2 [Bolli R., 2002]. Воспалительные посредники, такие как матричные металлопротеиназы (MMP), также регулируются оксидом азота. В течение мозговой ишемии ко-локализация MMP-9 с nNOS приводила к нитрозилированию MMP-9 и активированию его каталитической активности [Gu Z., 2002]. Ядерная сигнальная система также регулируется путем нитрозилирования. Транскрипционный фактор HIF1 $\alpha$  супрессирован при нормальном парциальном давлении кислорода. Нитрозилирование ODD (oxygen-dependent degradation) – домена HIF1 $\alpha$  в состоянии нормоксемии, вызывающего деградацию белка, стабилизирует HIF1 $\alpha$ . Селективное ингибирование нитрозилирования уменьшает активацию HIF1 $\alpha$  [Li F., 2007]. Транскрипционный фактор CREB (cyclic AMP response element-binding protein) также регулируется нитрозилированием. BDNF (brain-derived neurotrophic factor) инициирует NO-зависимую передачу сигнала, приводящую к нитрозилированию ядерных белков, которые затем связываются с CREB-таргетными генами [Riccio A., 2006].

Оксид азота вызывает индукцию таких генов, как гены белка теплового шока 70 кДа, HO-1, IL-8, ДНК-связывающего фактора c-Fos и нейроспецифичного белка Zif/268. Индукция опосредована NO-зависимой активацией факторов транскрипции AP-1 и NF- $\kappa$ B [Matthews J.R., 1996; Tabuchi A., 1996]. Окись азота влияет на активность ряда регуляторных GTPаз (семейство малых G-белков), из которых идентифицирован только один - H-Ras. NO через H-RAS инициирует действие разветвленной многокомпонентной эффекторной системы, передающей сигнал с плазматической мембраны в ядро клетки. Биологические эффекты NO в клетке связаны также с изменением проницаемости ионных каналов, главными из которых являются кальциевые каналы [Khan S.A., Hare J.M., 2003]. Увеличение внутриклеточной концентрации Ca<sup>2+</sup>, по данным L. Xu [Xu L. et al., 1998], способствует активации каспаз и инициации апоптоза.

Таким образом, показано участие оксида азота во многих физиологических и патологических процессах. Однако механизмы дисрегуляции внутриклеточной газовой коммуникации NO и их вклад в патогенез заболеваний остаются до конца неясными.

### **1.1.2. Сульфид водорода: физико-химические свойства, метаболизм и эффекты**

Сульфид водорода ( $H_2S$ ) - бесцветный, горючий, водорастворимый газ с запахом тухлых яиц, был известен в течение десятилетий из-за своей токсичности как загрязнитель окружающей среды [Lowicka E., Beltowski J., 2007]. Главный механизм токсичности  $H_2S$  - ингибирование митохондриального дыхания в результате блокирования цитохром с оксидазы [Gadalla M.M., Snyder S.H., 2010].

Продукция и утилизация сульфида водорода продемонстрирована для разных форм жизни, включая бактерий, беспозвоночных и млекопитающих. Физиологическая концентрация сульфида водорода в различных тканях составляет 20–160  $\mu M$ . Два пиридоксаль-5-фосфат зависимых фермента (цистатинин- $\beta$ -синтаза (CBS) и цистатинин- $\gamma$ -лиаза (CSE)) ответственны за эндогенную продукцию  $H_2S$  в тканях млекопитающих. Высокий уровень продукции  $H_2S$  был отмечен в мозге, сердце, сосудах, печени и почках. Единственным субстратом для производства эндогенного  $H_2S$  является L-цистеин. Показано, что путь синтеза  $H_2S$  связан с производством NO. Оксид азота увеличивает экспрессию и активность фермента CSE, но гидроксиламин (предшественник NO) ингибирует активность другого фермента - CBS. S-аденозилметионин и пиридоксаль-5'-фосфат стимулируют активность CSE, повышая продукцию  $H_2S$  [Vandiver M., Snyder S.H., 2012].

Сульфид водорода *in vivo* утилизируется путем окисления в митохондриях или метилированием в цитозоле. Также  $H_2S$  может утилизироваться через метгемоглобин [Iciek M., 2005] или металло- или дисульфидсодержащие молекулы, такие как окисленный глутатион [Stipanuk

М.Н., 2004]. Сульфид водорода экскретируется, главным образом, через почки в свободном виде или в виде конъюгированного сульфата [Kamoun P., 2004].

Изначально было высказано предположение, что некоторые эффекты сульфида водорода могут быть опосредованы защитой тиоловых групп белков от окисления. Однако исследования, проведенные на сегодняшний день, показывают, что действие  $H_2S$ , проявляющееся при физиологической концентрации, не воспроизводится полностью или лишь частично похоже на эффекты, опосредованные тиоловыми группами. Данный факт позволяет предположить, что антиоксидантный эффект не является основным механизмом действия  $H_2S$  in vivo [Ju Y., 2013]. Во многих системах влияние  $H_2S$  опосредовано через АТФ-чувствительные калиевые каналы ( $K^{ATP}$ ). Точный механизм, через который  $H_2S$  стимулирует  $K^{ATP}$  каналы, до сих пор остается неясным [Gadalla M.M., Snyder S.H., 2010]. Сульфид водорода является молекулой с высокой реакционной способностью и может легко вступать во взаимодействие с другими соединениями, особенно с активными формами кислорода и азота (ROS и RNS). Было показано, что  $H_2S$  реагирует, по крайней мере, с четырьмя различными АФК: супероксид анионом, перекисью водорода, пероксинитритом и гипохлоритом [Zhao W., 2003].

Установлено, что  $H_2S$  может участвовать в контроле процессов пролиферации и апоптоза (рис. 1). Сульфид водорода в концентрациях, соответствующих физиологическим, не вызывает гибель гладкомышечных клеток человека, однако в концентрации 200–500  $\mu M$  он увеличивает число клеток со специфическими маркерами апоптоза.

Сульфид водорода может ингибировать также клеточное деление. Стабильная сверхэкспрессия гена кодирующего цистатионин- $\beta$ -синтазу, угнетает пролиферацию и синтез ДНК [Yang G., 2004].  $H_2S$  вызывает транзиторное дозозависимое снижение среднего артериального давления у наркотизированных крыс [Zhao W., 2003]. В эксперименте in vitro показано, что  $H_2S$  и NaHS приводят к расслаблению грудной аорты крыс и воротной

вены. NaHS снижает сократительную способность миокарда *in vitro* и в естественных условиях. Было показано, что NaHS дозозависимо улучшает висцеральную ноцицепцию, вызванную у крыс при растяжении толстой кишки [Gadalla M.M., Snyder S.H., 2010].

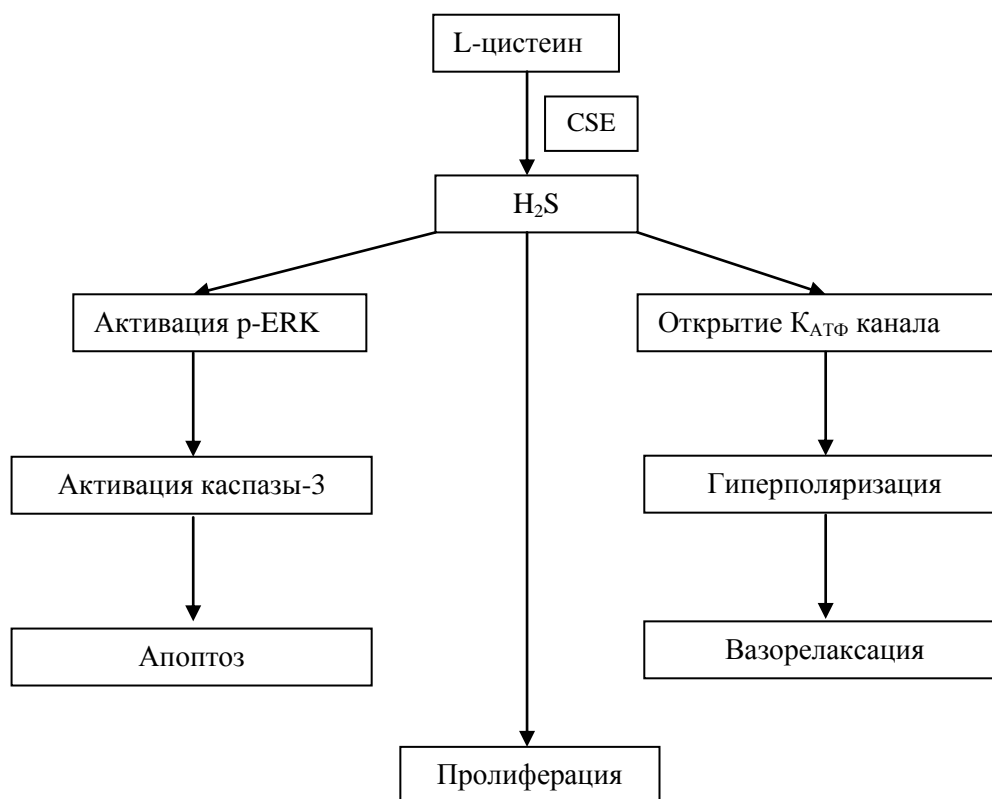


Рис. 1. Эффекты действия сульфида водорода (по данным С.W. Leffler, Н. Parfenova [2006])

Таким образом, второй член семейства внутриклеточных газовых транмиттеров вовлечен в функционирование множества клеточных систем, однако молекулярные механизмы его участия в регуляции жизнедеятельности клеток остаются мало изученными.

### 1.1.3. Монооксид углерода: физико-химические свойства, метаболизм и эффекты

Монооксид углерода – это двухатомная молекула, являющаяся химически стабильной, благодаря наличию тройной связи. При температуре выше  $-190^{\circ}\text{C}$  представляет собой газ без цвета и запаха. Удельный вес CO составляет  $0,967 \text{ н/м}^3$  относительно воздуха, плотность -  $1,25 \text{ г/л}$  при стандартной температуре и давлении [Wang R., 2004].

Главным продуцентом оксида углерода в человеческом организме является гемоксигеназа (НО). В биологических системах окисление гема осуществляют три изоэнзима гемоксигеназы - НО-1, НО-2 и НО-3. НО-1 является наиболее изученной изоформой гемоксигеназы. Активность данного фермента может увеличиваться до 100 раз в ответ на широкий спектр стимулов (металлы, гем, гормоны, трансформирующий фактор роста- $\beta$ , гипоксия, цитокины и др.). НО-2 была открыта сравнительно недавно. Данный изофермент является конститутивным и экспрессируется в мозге, эндотелии и яичках. Присутствие в организме различных изоформ гемоксигеназы является результатом транскрипции разных генов, экспрессирующихся в различных типах тканей. Первичная структура НО-1 и НО-2 представлена последовательностью из 91 аминокислотного остатка и на 58% является гомологичной. Часть вторичной структуры, являющейся каталитическим сайтом, гомологична на 100%. НО-1 имеет heat shock-зависимый регулирующий элемент и множество промотерных элементов, которые при связывании с соответствующими индукторами вызывают транскрипцию гена [Rochette L., 2013]. Индуктор-чувствительный элемент, названный StRE (стресс-ответственный элемент), содержит последовательность связывающего сайта для транскрипционного фактора AP-1 (activator protein-1). Показано, что ингибирование активности StRE приводит к снижению экспрессии mRNA гена НО-1 в клетках эндотелия сосудов человека, обработанных цитокинами [Rochette L., 2013]. Некоторые сигнальные молекулы (например, митоген-активируемые протеин киназы),

транскрипционные факторы (NF-E2-высвобождающий фактор-2, NIF-1, Bach-1), а также два энхансерных участка в 5'-регуляторном регионе, участвуют в регуляции гена ho-1 [Naito Y., 2008].

Третья изоформа (НО-3) экспрессируется в большинстве тканей, является конститутивной и по первичной структуре на 90% гомологична НО-2. Стимулы, моделирующие активность данной изоформы, остаются не известными [Rochette L., 2013]. Некоторые исследования показывают, что ген НО-3 представляет собой псевдоген, полученный из транскрипта гена НО-2, что не имеет никакой функциональной значимости [Hayashi S., 2004].

Значительно меньшие количества СО могут также образовываться другими путями, например при окислении липидов. Показано, что в физиологических условиях СО присутствует в тканях в микромолярных концентрациях [Wang R., Wu L., 2005]. Большая часть произведенного оксида углерода связывается с гемоглобином в эритроцитах в виде СОНЬ и выделяется через легкие [Wu L., 2005].

Увеличение продукции СО было продемонстрировано при хронических воспалительных болезнях легких, таких как обструктивная болезнь легких, фиброз и бронхиальная астма, а также при инфекционных поражениях легких. Точные механизмы, посредством которых СО действует на молекулярном уровне, по-прежнему неизвестны. Показано, что действие СО, в первую очередь, определяется его способностью связывать гемовые белки и ингибировать либо нарушать их биохимические функции. При взаимодействии с гемовыми белками СО влияет на электрон-транспортную цепь митохондрий и в зависимости от контекстных условий проявляет либо прооксидантный, либо антиоксидантный эффект [Koehler R., 2002].

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. Указанная слабая способность СО влиять на гуанилатциклазу имеет высокую физиологическую значимость. Полагают, что таким образом СО

способствует усилению вызванной оксидом азота активации гуанилатциклазы. Данный эффект CO усиливается неизвестными в настоящее время ко-стимуляторами. Производство цГМФ регулирует вазодилатацию, бронходилатацию, нейротрансмиссию и торможение агрегации тромбоцитов [Tsuburai T., Suzuki M., 2002]. Показано, что низкие концентрации CO стимулируют высвобождение NO и продукцию сильного окислителя пероксинитрита в клетках сосудов [Brouard S., 2000].

Оксид углерода может влиять на экспрессию генов несколькими путями. Во-первых, увеличение концентрации CO *in vivo* приводит к образованию карбоксигемоглобина, снижению оксигенации и гипоксии. Гипоксия - это физиологический регулятор важных биологических процессов, таких как эритропоэз, ангиогенез, гликолиз и клеточное восстановление [Kourembanas S., 2002]. Комплексный эффект монооксида углерода на экспрессию генов в условиях гипоксии требует детального разъяснения. Предполагается, что CO ингибирует экспрессию генов, кодирующих вазоконстрикторы в гладкомышечных клетках в начальную фазу гипоксии [Kourembanas S., 2002]. Однако в течение хронической гипоксии низкий уровень монооксида углерода может приводить к увеличению продукции ростовых факторов и вазоконстрикторов, что промотирует ремоделирование сосудистой стенки. Основным молекулярным сенсором уровня O<sub>2</sub> в клетке - это транскрипционный фактор HIF-1. В функциональном состоянии это гетеродимер, состоящий из двух субъединиц, HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$ . Данный гетеродимер связывается с распознающим сайтом (HRE — hypoxia response element), находящимся на множестве генов регулируемых гипоксией, таких как эритропоэтин, VEGF, HO-1 или индуцибельная NO-синтаза [Dulak J., Jozkowicz A., 2003].

Во-вторых, местные эффекты CO могут быть вызваны его взаимодействием с NO. Комбинация высоких концентраций NO и CO может влиять на митохондриальный цитохром, вызывая его ингибирование и образование активных форм кислорода (АФК). Индуцированное

монооксидом углерода образование АФК может влиять на активность некоторых транскрипционных факторов и киназ, в частности, на NF-κB и p38 киназы [Kietzmann T., Samoylenko A., 2003]. В-третьих, клеточный эффект CO может быть независимым от гипоксии и взаимодействия с NO. Оксид углерода может индуцировать образование эндогенного пероксида через индукцию экспрессии супероксиддисмутазы (MnSOD) [Frankel D., 2000] или через ингибирование каталазной активности [Zhang R., 2007]. В свою очередь, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> является важным клеточным мессенджером, регулирующим экспрессию множества генов [Dulak J., Józkwicz A., 2003].

Кроме того, монооксид углерода опосредует фосфорилирование eEF2 и инактивацию 4E-BP1, что приводит к подавлению синтеза всех белков в клетке. Эти наблюдения были связаны с ингибированием PI3K-Akt-mTOR пути и повышением внутриклеточной концентрации кальция и cAMP. Помимо этого, CO опосредовал ингибирование синтеза белка в результате подавления экспрессии циклина D1 и циклина E с последующим снижением фосфорилирования белка Rb и остановку клеточного цикла в сверочной точке фазы G(0)/G(1). Авторы показали, что применение CO-высвобождающих молекул возможно для лечения фиброза, воспаления, рака и других патологических состояний, сопровождающихся избыточным синтезом белка и гиперпролиферацией [Schwer C.I., 2013].

Многообразие эффектов CO было выявлено при изучении внутриклеточных путей сигнальной трансдукции. Показано, что CO модулирует активность рецептора активации пероксисомной пролиферации (PPAR), белка теплового шока 70 кДа, MAPK, STAT, NF-κB, интерферон-регулирующего фактора (IRF), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K/AKT) и NO синтазы (NOS)/NO. Указанные молекулы причастны к клеточно-специфической защите и поддержанию гомеостаза. Хотя многие из описанных сигнальных путей взаимосвязаны, CO модулирует их активацию и функционирование за счет различных механизмов в зависимости от типа клеток [Peyton K.J., 2002].



Большое внимание исследователей в настоящее время приковано к участию монооксида углерода в регуляции воспалительной реакции. Было показано, что в физиологических концентрациях СО ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов. В макрофагах, обработанных монооксидом углерода, продукция таких проинфламаторных цитокинов как TNF- $\alpha$ , MIF (фактор иммобилизующий макрофаги) и IL-1 снижалась. Также СО является положительным регулятором синтеза противовоспалительного цитокина IL-10 [Wang R., Wu L., 2005].

Показано участие монооксида углерода в регуляции пролиферации клеток. Ростовые факторы, такие как PDGF-BB и трансформирующий фактор роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), индуцирующие пролиферацию гладкомышечных клеток, усиливают экспрессию гемоксигеназы-1. Существует предположение, что индукция экспрессии HO-1 представляет равновесный механизм, который ограничивает пролиферацию гладкомышечных клеток. Эффект СО на деление ГМК может быть опосредован через влияние на транскрипционные факторы, например E2F, являющиеся специфичными для клеточного цикла. Они регулируют экспрессию многих генов, вовлеченных в клеточное деление, и управляют переходом клеток из G<sub>1</sub> в S фазу [Martin D., 2004].

Установлено, что СО индуцирует расслабление мышечной стенки всех сосудов. Воздействие СО на легочную циркуляцию может иметь различные эффекты. В ответ на гипоксию системные кровеносные сосуды расширяются, а легочные - сужаются. Вдыхание СО предотвращает сужение сосудов легких при гипоксии у собак. Однако R. Wang [2005] было показано, что низкие концентрации монооксида углерода не изменяют вазоконстрикцию, индуцированную гипоксией у крыс. Таким образом, монооксид углерода является важнейшей внутриклеточной сигнальной молекулой, регулирующей функции различных систем. Однако точные молекулярные мишени и пути внутриклеточной трансдукции сигнала с участием данного газотрансмиттера остаются неясными.

### 1.1.4. Внутриклеточные газы – регуляторы апоптоза

Влияние членов семейства газовых трансммиттеров на апоптоз носит весьма сложный характер. В работах разных авторов показаны как про-, так и антиапоптотические эффекты NO, CO и H<sub>2</sub>S. Кроме того, множество проведенных исследований показывают, что эффекты последних напрямую зависят и от типа клеток. Сравнительная характеристика эффектов газовых трансммиттеров на различные типы клеток (табл.1) дана ниже.

Таблица 1

#### Эффекты газовых трансммиттеров на апоптоз различных типов клеток

Тип клеток	NO	CO	H <sub>2</sub> S
Клетки поджелудочной железы	Ингибирование [Bachar E., 2010], стимулирование [Ansar M.M., 2006]	Ингибирование [Gunther L., 2002]	Стимулирование [Cao Y., 2006]
Лимфоциты	Ингибирование [Mannick J.V., 1994]	Данные отсутствуют	Стимулирование [Rinaldi L., 2006]
Эозинофилы	Ингибирование [Beauvais F., 1995]	Данные отсутствуют	Нет эффекта [Rinaldi L., 2006]
Фибробласты	Стимулирование [Seo T., 2012]	Ингибирование [Petrache I., 2000]	Стимулирование [Baskar R., 2007]
Гладкомышечные клетки	Стимулирование [Chiche J.D., 1998]	Стимулирование [Liu X.M., 2002]; Ингибирование [Liu X.M., 2002]	Стимулирование [Yang G., 2006]
Эндотелиальные клетки	Ингибирование [Dimmeler S., 1997]	Ингибирование [Soares et al. 2002], [Brouard et al. 2002], Стимулирование [Thom S.R., 2000]	Ингибирование [Shen Y., 2013]
Эпителиальные клетки	Данные отсутствуют	Ингибирование [Li Y., 2012]	Ингибирование [Liu W.L., 2013]
Гепатоциты	Ингибирование [Kim Y.M., 1997]	Ингибирование [Zuckerbraun B.S., 2003]	Ингибирование [Zhang Q., 2013]
Тимоциты	Стимулирование [Fehsel K., 1995]	Стимулирование [Turcanu et al. 1998]	Данные отсутствуют

При индукции апоптоза окисью азота митохондрии выполняют функцию сенсора данной сигнальной молекулы. Указанные органеллы содержат большое количество гемсодержащих, железо- и серосодержащих белков, с которыми NO (или ONOO<sup>-</sup>) активно соединяется при низких

(наномолярных) концентрациях [Реутов В.П., 2002]. Активность митохондриальных белков суммируется в форме трансмембранного электроосмотического потенциала  $\Delta\psi$ , и их ингибирование окисью азота вызывает деполяризацию внутренней митохондриальной мембраны, выход апоптозиндуцирующих факторов и дальнейшее развитие апоптоза [Hortelano S., 1997]. NO способен напрямую индуцировать высвобождение цитохрома *c* без активации каспазы-8 и расщепления белка Bid. Кроме активации митохондриального пути, оксид азота может модулировать и ядерный путь. Так, имеются данные о том, что NO-опосредованное накопление белка p53 индуцирует арест клеточного цикла через активацию p21 или апоптоз - через активацию белка Bax. Однако проапоптотический эффект оксида азота может реализовываться не только описанными выше путями. Показано, что индукция апоптоза может быть блокирована ингибированием растворимой гуанилатикалазы или цГМФ-зависимой протеинкиназы [Choi В.М., 2002].

Существуют данные, показывающие, что оксид азота способен регулировать экспрессию рецепторов апоптоза. Известно, что NO праймирует  $\beta$ -клетки поджелудочной железы к Fas-индуцированному апоптозу через повышение экспрессии на их поверхности CD95 рецепторов [Lee J.Y. et al., 2007]. Исследования ряда авторов продемонстрировали, что оксид азота напрямую действует на негативные регуляторные транс-активационные домены промотора гена Fas. Было установлено, что NO повышает экспрессию Fas рецептора различных опухолевых клеток. Указанное действие оксида азота связано с инактивацией ДНК-связывающей активности транскрипционного репрессора Yin-Yiag 1 (YY1) к сайленсерному региону Fas промотора [Garban H.J. et al., 2001]. YY1 представляет собой повсеместно присутствующий мультифункциональный цинксодержащий транскрипционный фактор (также известный как дельта фактор, NF-E1, UCRBP и CF1). YY1 вовлечен в активацию экспрессии апоптоз-ассоциированных молекул (NF- $\kappa$ B, Fas, DR5 (TRAIL рецептор) и др.). Было показано, что механизм NO-опосредованного ингибирования YY1

ДНК-связывающей активности связан с S-нитрозилированием определенных цистеиновых остатков. Это приводит к ингибированию репрессорной активности YY1 и повышению экспрессии Fas и CD95 с последующей сенсibilизацией опухолевых клеток к Fas-, TRAIL-индуцированному апоптозу [Hongo F. et al., 2005]. Позднее J.Y. Lee et al. [2007] была выявлена специфическая роль оксида азота в регуляции экспрессии гена DR5 (TRAIL рецептора) за счет отмены репрессорной активности YY1.

Антиапоптотический механизм действия оксида азота заключается в стабилизации каспаз посредством S-нитрозилирования, что препятствует их активации и блокирует Fas-индуцированный путь развития запрограммированной гибели клетки [Leon-Bollotte L., 2011]. Как полагают, антисуицидальный эффект NO в лейкоцитах, гепатоцитах, трофобластах и эндотелиальных клетках может быть вызван через нитрозилирование и инактивацию каспаз-3, -1, -8, -9 [Borutaite V., 2000; Kim Y.M., 2000; Török N.J., 2002]. Пр продемонстрировано, что оксид азота способен отменять апоптоз нейтрофилов при окислительном стрессе *in vitro* и воспалении [Степовая Е.А., 2008]. Кроме того, показано, что молекулярный механизм, лежащий в основе NO/цГМФ-опосредованного антиапоптотического эффекта, может частично вовлекать активацию Akt/PKB, которая индуцирует фосфорилирование белка Bad и прокаспазы-9, а также цитопротекторные гены через активацию NF-κB [Choi В.М., 2002]. Помимо этого, имеются данные, свидетельствующие о том, что NO способен блокировать высвобождение цитохрома *c* через подавление расщепления белка Bid посредством прямого ингибирования активности каспазы-8 [Choi В.М., 2002].

Антиапоптотический потенциал оксида углерода был впервые продемонстрирован в экспериментальных условиях. Так, добавление в клеточные культуры экзогенного СО препятствовало TNF-индуцированному апоптозу мышинных фибробластов и эндотелиальных клеток. Подобный антиапоптотический эффект наблюдался в условиях *in vitro* при

гиперэкспрессии HO-1 [Inguaggiato P., 2001]. В культуре эндотелиальных клеток ингибирующее влияние окиси углерода на TNF-индуцированный апоптоз может быть отменено воздействием на клетки SB203580 – селективного химического ингибитора p38 MAP киназы - или доминантной негативной мутацией p38 MAPK. Данный факт подтверждает ключевую роль указанной киназы в CO-индуцированном рецепторном пути инициации апоптоза [Chen K., 2000]. Показано, что CO может активировать p38 MAPK для ингибирования митохондриального пути апоптоза и способствовать фосфорилированию ERK MAPK, индуцирующему рецепторный путь апоптоза [Song R., 2004]. Антиапоптотический эффект CO, показанный на культуре фибробластов, опосредован активацией гуанилатциклазы [Petrache I., 2000]. Индукция cGMP пути, в дополнение к MAPK пути, обеспечивает антиапоптотический эффект CO в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы [Gunther L., 2002]. Показано что, HO-1 или CO защищают эндотелиальные клетки от TNF-опосредованного апоптоза за счет активации NF- $\kappa$ B-зависимых антиапоптотических генов [Petrache I., 2000]. Гиперэкспрессия гемоксигеназы или добавление экзогенного оксида углерода также защищают гепатоциты от апоптоза [Zuckerbraun B.S., 2003].

В некоторых моделях заболеваний и повреждений тканей, например, при трансплантации легких, отмечался антиапоптотический эффект от предварительной обработки окисью углерода в низких концентрациях *in vivo*. Ингаляция грызунами оксида углерода в более высоких дозах вызывала апоптоз нейронов, особенно в областях мозга, связанных с отравлением угарным газом [Wang R., 2004].

Существуют работы, показывающие проапоптотическое действие CO в эндотелиальных клетках при низких концентрациях данного газа [Thom S.R., 2000]. Fas/CD95-индуцированный апоптоз клеточной линии Jurkat увеличивался при воздействии монооксида углерода. Отчасти это может быть обусловлено с CO-индуцированной активацией проапоптотического белка FADD и активацией каспаз-8, -9 и -3. Данный проапоптотический эффект CO

не связан с увеличением продукции свободных радикалов и ингибированием антиапоптотических членов семейства Bcl (например, Bcl-XL) и нивелируется после повышения экспрессии FADD siRNA. Ингибирование Fas/CD95-индуцированной активации ERK MAPK является ключевым событием CO-опосредованного апоптоза. Оксид углерода снижает также экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2 [Ke B., Buelow R., 2002].

Установлено, что сульфид водорода может оказывать как про-, так и антиапоптотический эффект в зависимости от типа клеток и внутриклеточной концентрации. H<sub>2</sub>S индуцирует апоптоз гладкомышечных клеток аорты человека [Yang G., 2004]. С другой стороны, NaHS (донор H<sub>2</sub>S) ингибирует апоптоз изолированных нейтрофилов человека и не оказывает никакого эффекта на их бактерицидные свойства [Wang R., 2004]. В ряде исследований показано, что NaHS не влияет на жизнеспособность эозинофилов и повышает апоптоз лимфоцитов [Cao Y., 2006].

В культуре мышинных макрофагов RAW264.7 H<sub>2</sub>S подавлял LPS-индуцированную экспрессию индуцибельной NO-синтазы (iNOS). Данный эффект был опосредован H<sub>2</sub>S-индуцированной активацией ERK, повышенной экспрессией гемоксигеназы-1, продукцией окиси углерода и CO-опосредованным ингибированием провоспалительных факторов транскрипции, в частности NF-κB [Hagiwara S., 2007].

Показано, что обработка клеток поджелудочной железы сульфидом водорода способна активировать фосфорилирование киназ MAP-сигнального каскада и в результате - активировать апоптоз. Все три стресс-индуцибельные MAP киназы активируются после воздействия на клетки донора H<sub>2</sub>S. Указанный эффект блокируется после использования соответствующих ингибиторов. Ингибирование ERK1/2 с помощью PD98059 вызывает дальнейшее усиление апоптоза, тогда как влияние SP600125 на JNK и SB203580 на p38 MAPK связано с угнетением апоптоза. Было показано, что H<sub>2</sub>S индуцирует апоптоз в инсулинсекретирующих клетках через активацию p38 MAPK [Cao Y., 2006]. В гладкомышечных клетках

стенки аорты человека ERK играла активную роль посредника в апоптозе [Yang G., 2004]. Эти данные также коррелируют с изменениями содержания проапоптотического протеина Вах [Yang G., 2004]. Воздействие PD98059 на клетки приводит к увеличению уровня Вах, тогда как добавление SP600125 и SB203580 сопровождается уменьшением его содержания.

Установлено, что NaHS-индуцированный апоптоз в клетках поджелудочной железы опосредует снижение Bcl-2, следствием чего является активация каспазы-3. Однако добавление к гладкомышечным клеткам аорты человека H<sub>2</sub>S существенно не изменяет содержания Вах и Bcl-2 [Cao Y., 2006].

Сравнительная характеристика молекулярных мишеней действия газовых трансммиттеров представлена в таблице 2.

Таблица 2

Молекулярные мишени про- и антиапоптотических эффектов газовых трансммиттеров

Мишень	NO	CO	H <sub>2</sub> S
CD95/Fas/Apo-1, TNFR1	Данные отсутствуют	Ингибирует [Zhang X., 2003]	Не изменяется [Kim Y.M., 1999]
FADD and TRADD	Данные отсутствуют	Повышается [Song R., 2004]	Данные отсутствуют
Cytochrome c	Блокирует высвобождение [Kim Y.M., 1998]	Блокирует высвобождение [Zhang X., 2003]	Высвобождает [Cao Y., 2006]
Caspase-9	Ингибирует [Choi B.M., 2002]	Данные отсутствуют	Стимулирует [Yang G., 2006]
Caspase-8	Ингибирует [Choi B.M., 2002]	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют
Caspase-3	Ингибирует [Choi B.M., 2002]	Ингибирует [Zhang X., 2003]	Стимулирует [Yang G., 2004], Ингибирует [Rinaldi L, 2006]
P53	Повышает [Messmer U.K., 1996]	Понижает [Liu X.M., 2002], повышает [Sun X.J., 2010]	Повышает [Yang G., 2006]
Отношение Вах/Bcl-xL	Увеличивает [Messmer U.K., 1996]	Снижает [Zhang X., 2003]	Не изменяет [Yang G., 2006]

Таким образом, не только тип клеток, но и тип индуктора апоптоза, конкурентная активация различных сигнал-передающих внутриклеточных

путей могут определять про- или антиапоптотический эффект действия NO, H<sub>2</sub>S и CO на клетки. Данные о молекулярных механизмах влияния газовых трансмиттеров на процессы реализации программированной гибели клеток остаются весьма противоречивыми.

## 1.2. Молекулярные механизмы апоптоза

Апоптоз является тем механизмом, который обуславливает удаление клеток с определенной рецепторной специфичностью и составляет основную сущность отрицательной селекции потенциально аутоагрессивных лимфоцитов, элиминации инфицированных либо чужеродных для макроорганизма клеток. Наличие в организме физиологических индукторов и ингибиторов апоптоза позволяет предположить, что программированная гибель клетки зависит от соотношения факторов, инициирующих апоптоз и предотвращающих его, а также от регуляторных внутриклеточных реакций [Ouyang L., 2012]. Показано, что одним из элементов системы индукции апоптоза является MAP (mitogen activated protein)-киназный каскад [Ярилин А.А., 2004].

В развитии апоптоза выделяют три стадии: индукторная, эффекторная и стадия деградации. Индуцировать апоптоз могут как внутриклеточные сигналы, так и внешние, опосредующие свое действие через рецепторные системы. К физиологическим активаторам апоптоза относятся цитокины (интерлейкины, фактор некроза опухоли, интерфероны, колониестимулирующие факторы, пептидные ростовые факторы) и гормоны (глюкокортикоиды, половые гормоны, гормоны гипофиза). Их влияние на клетки неоднозначно: для одних клеток они выступают в роли индуктора, для других - ингибитора апоптоза. Это зависит от типа клетки, стадии ее дифференцировки и функционального состояния [Gulbins E., 2000].

Выделяют два основных пути развития апоптоза: внешний (или путь от рецептора смерти) и внутренний (или митохондриальный путь). Показано, что данные пути являются связанными, и молекулы одного могут влиять на



развитие другого [Krammer P.H., 2000]. Кроме того, имеется дополнительный путь, который вовлекает Т-цитотоксические лимфоциты и перфорин/гранзим-зависимые клетки. Внешний, внутренний и гранзим В-зависимый пути сходятся в итоге в фазе деградации. Эта фаза инициируется расщеплением каспазы-3 и, как результат, дефрагментацией ДНК, деградацией ядерных белков и белков цитоскелета, сшивкой белков, образованием апоптотических телец, экспрессией лигандов для рецепторов фагоцитов и финальным поглощением. Гранзим А-зависимый путь, способный активироваться параллельно, является каспаз-независимым путем клеточной гибели и реализуется через одностороннее повреждение ДНК [Martinvalet D. et al., 2005].

Активация митохондриального и рецепторного путей апоптоза обуславливает запуск каскада реакций активации семейства протеаз, называемых каспазами. В каскаде реакций активации каспаз выделяют две функциональные группы протеазных молекул: инициаторы и эффекторы. Первым (каспаза-2, -8, -9, -10) принадлежит роль активирования новых видов протеиназ. Эффекторы же (каспаза-3, -6, -7) вызывают деструкцию специфических субстратов, нарушая интеграцию клеточных подсистем. Обе группы характеризуются существенными различиями в структуре терминального домена. У инициаторов он достаточно длинный (более 100 аминокислотных остатков), у эффекторов – обычно в 3-4 раза короче. Вместе с тем, не все эффекторные каспазы инактивируют белки [Denault J.V., 2002].

Таким образом, пути инициации апоптоза различны, однако в итоге сводятся к необратимому повреждению генетического материала клетки. Место внутриклеточных газовых трансмиттеров в указанном каскаде реакций будет определено в нашем исследовании.

### **1.2.1. МАРК каскады в трансдукции сигнала апоптоза**

Апоптоз служит основным механизмом точной регуляции клеточной численности за счет удаления ненужных и потенциально опасных клеток.

После получения внеклеточных сигналов в виде митогенного или мутагенного воздействия, а также в ответ на действие цитокинов, индуцирующих воспаление или апоптоз, в клетках начинают развиваться каскады реакций фосфорилирования. Последние осуществляются различными семействами протеинкиназ, одним из которых является семейство MAPK (mitogen activated protein kinases). Завершается каскад реакций специфической активацией или подавлением активности факторов транскрипции или других регуляторных белков, что сопровождается изменением уровня экспрессии соответствующих генов [Zarubin T., 2005].

MAPK являются серин/треониновыми протеинкиназами, которые могут фосфорилировать цитоплазматические и ядерные мишени [Nebreda A.R., Porras A., 2000; Pearson G., 2001]. Семейство MAP киназ включает четыре небольших подсемейства протеинкиназ - p38, ERK (extracellular signal-regulated kinases), JNK/SAPK (c-jun N-terminal or stress-activated protein kinases) и BMK1 (ERK/big MAP kinase 1) [Zarubin T., 2005]. Основным элементом всех MAPK внутриклеточных путей принято считать трехкомпонентный протеинкиназный каскад. Внутри него MAPK фосфорилируются и активируются протеинкиназами МКК (MAPK Kinase/MAPKK), которые имеют двойную специфичность и могут фосфорилировать как тирозиновые, так и треониновые остатки. МКК, в свою очередь, аутофосфорилируются и активируются серин-треониновыми протеинкиназами МККК (MAPK Kinase Kinase)/MAPKKК. Такие трехкомпонентные каскады протеинкиназ являются эволюционно консервативными у всех эукариот – от дрожжей до человека [Johnson G.L., 2007].

По некоторым данным, активация протеинкиназ семейства ERK связана с клеточным выживанием и стимуляцией пролиферации, а активация протеинкиназ семейств p38 и JNK — с индукцией апоптоза [Johnson G.L., 2007].

Антагонизм различных путей трансдукции сигнала является основным регулирующим механизмом в клетках. Пути, ведущие к активации ERK и JNK, состоят из нескольких компонентов, большинство из которых регулируются фосфорилированием белка. Активация JNK и p38 MAP-киназы, по-видимому, противоположна активации ERK, и динамический баланс между увеличением активированных ERK и стресс-активированных JNK-p38 MAP-киназ считается важным в определении выживет клетка или погибнет за счет апоптоза [Ono K., 2000].

Основными мишенями MAPK являются транскрипционные факторы, изменяющие в клетках экспрессию генов. Показано, что JNK/SAPK фосфорилируют факторы семейства Jun [Delaney J., 2008]. Данные факторы способны гетеродимеризоваться с белками FOS, образуя комплексы, регулирующие транскрипцию многих генов [Dickinson R.J., Keyse S.M., 2006]. Кроме того, MAPK p38 фосфорилирует и усиливает активность транскрипционного фактора MEF2C и других белков этого семейства [Johnson G.L., 2007]. Киназа p38 является редокс-регулируемым элементом сигнальных путей и активирует NF-κB. Она функционирует как регулятор экспрессии MAO (моноаминоксидаза) в апоптотических клетках, участвует в стабилизации мРНК MAO [Brancho D., 2003].

Существует достаточно большое количество транскрипционных факторов, фосфорилируемых MAPK. К ним относят C-jun, ATF2, Elk-1, P53, NFAT, с-Мус и др. [Delaney J., 2008]. Существуют данные о том, что MAPK могут регулировать экспрессию генов и на посттранскрипционном уровне. Так, в активированных Т-лимфоцитах JNK участвует в стабилизации мРНК интерлейкина 2 (IL- 2) [Hochedlinger K., Wagner E.F., Sabapathy K., 2002]. Имеются данные, что MAPK вовлечены также в контроль процесса трансляции.

Активаторами JNK и p38 являются цитокины, АФК, ультрафиолетовое излучение, ингибиторы синтеза белка и другие стрессовые воздействия [Broom O.J., 2009]. Большинство этих факторов активируют

белки МАРККК (МАРК Kinase Kinase), которые запускают сигнальный каскад (рис. 2).

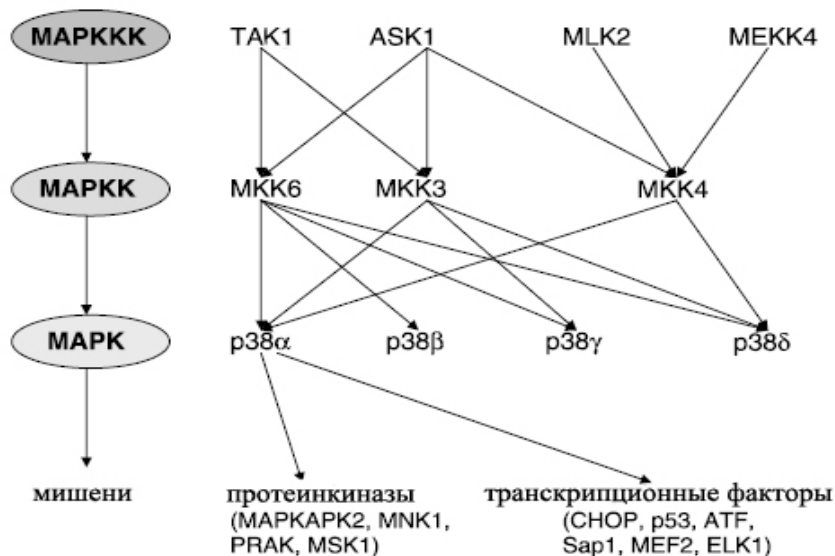


Рис. 2. Сигнальный путь p38 МАР киназы [по данным Т. Zarubin, J. Han, 2005]

Множество работ указывают на участие JNK в различных стрессовых реакциях, однако универсального пути активации JNK не обнаружено [Delaney J., 2008]. Повышенное содержание активных форм кислорода часто коррелирует с повышенным уровнем фосфорилирования JNK и p38 МАРК [Wang Z.H., Kang K.A., 2010].

Для p38 установлены две МАРКК, МКК3 и МКК6 [Pearson G., 2001]. В то время, как МКК6 является общим активатором для всех изоформ p38, МКК3 неспособна активировать p38β, несмотря на 80% гомологичность между данными МКК. Показано, что в отдельных типах тканей МКК4, вышележащая киназа JNK может содействовать активации p38α и p38δ. В дополнение к этому, имеется также МАРКК-независимый механизм активации p38, вовлекающий ТАВ1, биологический смысл которого до сих пор не установлен [Zarubin T., 2005].

К настоящему времени накоплены фактические данные, демонстрирующие проапоптотическую и антиапоптотическую роль p38 МАРК, реализующуюся в зависимости от типа клеток и действующего

стимула. Гиперэкспрессия МКК6 защищает кардиомиоциты от апоптоза, опосредованного стимуляцией  $\beta$ -адренергического рецептора [Saurin A.T., 2000]. Установлено, что ранняя активация p38 необходима и достаточна для защиты клеток линии Кум от TNF- $\alpha$ -опосредованного апоптоза, экспрессия p38 $\beta$  приводит к снижению апоптоза, индуцированного FasL и ультрафиолетовым излучением [Valladares A., 2000]. Рядом авторов показано, что активация p38 приводит к угнетению экспрессии Fas рецептора, тем самым, предотвращая апоптоз. Существуют данные о проапоптотической роли p38 (например, показано, что p38 является медиатором апоптоза в нейронах и кардиомиоцитах). В других типах клеток p38 киназа активирует апоптоз, опосредованный TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  или окислительным стрессом [Edlund S., 2003].

Показано, что MAPK каскад активирован в различных клеточных линиях, включая неонатальные кардиомиоциты, NIH 3T3 клетки, клетки карциномы KB-3, клеточную линию H9, клетки аденокарциномы легких H522 и клетки нейробластомы [Broom O.J., 2009]; вместе с тем, роль MAPK варьирует в различных типах клеток.

Таким образом, каждая из указанных MAP киназ имеет уникальное значение в регуляции клеточного метаболизма и экспрессии генов, связанных с ростом, апоптозом и клеточным ответом на внешние раздражители [Davies S.P., 2000].

### **1.2.2. Белки – регуляторы апоптотического процесса**

В общем сигнальном пути, приводящем к развитию апоптоза, выделяют две контрольные точки, в которых возможен выбор между реализацией запрограммированной гибели и выживанием клетки. Этот выбор осуществляется с участием ряда родственных молекул. На первом этапе в качестве таких регуляторов выступают белки семейства Bcl-2.

Белок Bcl-2, ассоциированный с транслокацией t(14;18) в клетках фолликулярной лимфомы, был первым примером онкогена, который

ингибирует клеточную смерть, а не промотирует пролиферацию. Установлено, что в структуре белков семейства Bcl-2 присутствует мотив консервативной последовательности, известный как Bcl-2 гомологичные домены (BH1-BH4). У млекопитающих описано свыше 30 членов семейства Bcl-2, одни из которых имеют антиапоптотическую, другие - проапоптотическую функцию [Borner C., 2003]. Кроме самого Bcl-2, существует множество антиапоптотических белков (Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, A1, Mcl-1 и т.д.), обладающих доменами BH1, BH2, BH3, и BH4. Проапоптотическая группа членов семейства Bcl-2 может быть разделена на две подгруппы. Первая подгруппа включает протеины Bax, Bak и Bok, содержащие домены BH1, BH2 и BH3. Белки второй подгруппы (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP3 и Spike) имеют только короткий BH3 мотив – реакционный домен, который является необходимым и достаточным для их киллерной функции [Cory S., 2002].

Существует несколько теорий, описывающих влияние белков семейства Bcl-2 на процессы реализации апоптоза. Одна модель предполагает, что члены семейства Bcl-2 могут непосредственно контролировать активацию каспаз [Strasser A., 2000]. С другой точки зрения, данные протеины, главным образом, обеспечивают целостность митохондрий [Wang R., 2001].

Сверхэкспрессия антиапоптотических белков ингибирует апоптоз, вызванный многими цитостатическими сигналами, подавляя продукцию АФК, стабилизируя  $\Delta\psi$ , предотвращая пермеабиллизацию митохондриальной мембраны и, следовательно, блокируя выход цитохрома *c* [Borner C., 2003]. Показано, что, помимо антиапоптотических эффектов на митохондриальном уровне (косвенным управлением активацией апоптосомы), Bcl-2 ингибирует также пути апоптоза, которые являются независимыми от Araf-1/каспазы-9 и которые имеют каспазу-7 как центральный эффектор [Marsden V.S., 2002]. В этом контексте можно предположить о существовании другого, до сих пор не

идентифицированного гомолога Araf-1, который может непосредственно контролироваться Bcl-2/Bcl-XL [Puthalakath H., 2002].

Таким образом, баланс между про- и антиапоптотическими членами семейства Bcl-2 определяет выбор клетки между жизнью или смертью путем апоптоза.

Второй контрольной точкой в определении судьбы клетки является действие белков, ингибирующих дистальные участки апоптоза. Известны белки, ингибирующие каспазу-8 (FLICE-протеазу). Они получили название с-FLIPs (FLAME/Casper/CASH/usurpin). Основной их характеристикой является наличие двух N-терминальных DED-доменов и отсутствие DD-домена, что позволяет белкам FLIP присоединяться к FADD и значительно замедлять активацию каспазы-8. Более того, в составе DISC с-FLIP вызывают каскад реакций, приводящих к активации митоген-активированной протеинкиназы ERK, с одной стороны, и транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, с другой стороны. Оба пути приводят к дифференцировке или усилению пролиферативной активности клеток, несмотря на то, что изначально инициировался проапоптотический путь трансдукции сигнала [Hu W.H., 2000].

Другая группа ингибиторов апоптоза относится к семейству белков IAP (апоптоз-ингибирующих белков). В настоящее время у человека идентифицированы 6 видов белков IAP-семейства: NAIP, cIAP-1, cIAP-2, XIAP, survivin и BRUCE [Jost P.J., 2009].

Все IAP-протеины содержат BIR (baculovirus IAP repeat) домен, последовательность, состоящую из 70 аминокислот [Takahashi R., 2001]. Именно этот BIR домен непосредственно взаимодействует с каспазами, что является основным антиапоптотическим эффектом IAP. Показано, что XIAP, c-IAP1 и c-IAP2 непосредственно ингибируют каспазу-3, -7 и -9 [Salvesen G.S., 2008]. Для XIAP установлено наличие двух активных доменов, BIR3 непосредственно связывается с малой субъединицей каспазы-9, тогда как

область BIR2 взаимодействует с активным сайтом субстрат-связывающей области каспаз-3 и -7 [Huang Y., 2001; Srinivasula S.M., 2001].

В дополнение к областям BIR, белки с-IAP1, с-IAP2 и XIAP содержат высоко консервативный RING (really interesting new gene) домен на С-терминальном конце, который обладает E3 убиквитинлигазной активностью. 76-аминокислотный белок убиквитин служит «черной меткой»: присоединившие его белки подвергаются протеолизу. Через этот RING домен IAP в состоянии катализировать свою собственную убиквитинацию, таким образом, определяя свою деградацию посредством протеасомы [Varfolomeev E., Blankenship J.W., 2007]. Показано также, что они могут направлять другие белки, например каспазы-3 и -7, на убиквитинацию и деградацию [Huang H., 2000; Suzuki Y., 2001].

Как все ингибиторы протеаз, XIAP, сIAP1 и сIAP2 сами подвержены отрицательной регуляции. В частности, 25 кДа митохондриальный полипептид Smac/DIABLO (direct IAP binding protein with low pI), выходя из митохондрий в цитозоль, связывается с ними и нарушает их связывание с каспазами [Srinivasula S.M., 2001], ускоряя, таким образом, их активацию [Nicholson D.W., 2002]. Аналогичным эффектом обладает Omi/HtrA2 (Omi stress-regulated endopeptidase/high temperature requirement protein A2) [Suzuki Y., 2001]. При гиперэкспрессии каспазы-3 и -7 могут сами расщеплять XIAP [MacFarlane M., 2002]. По некоторым данным, XIAP, сIAP-1 и -2 способны противостоять ингибирующему действию Smac/DIABLO, присоединяя к нему убиквитин [Fu J., Jin Y., 2003; Hu S., Yang X., 2003]. Одна из изоформ Smac/DIABLO, Smac3, в свою очередь, стимулирует присоединение убиквитина к XIAP [Jost P.J., 2009].

XIAP (X-связанный белок-ингибитор апоптоза) – это член семейства IAP, являющийся внутриклеточным антиапоптотическим белком. Данный протеин играет ключевую роль в выживании клетки за счет изменения проапоптотических сигнальных путей на постмитохондриальном уровне [Jost P.J., 2009]. Индуцирование экспрессии или снижение деградации XIAP



может являться механизмом, используемым клетками для ингибирования клеточной смерти. Взаимодействие XIAP с Akt или ERK путями до сих пор полностью не исследовано. Показано, что Akt и Raf-1 могут фосфорилировать XIAP и ингибировать его разрушение [Keramati A.R., 2008]. Однако ингибирование PI-3/Akt и/или ERK путей приводит к низкой экспрессии XIAP при острой миелоидной лейкемии [Dan H.C., 2004; Tian S., 2006]. Хотя проведенные исследования показали наличие взаимодействий между этими путями, дальнейшие исследования в данной области не проводились. В литературе приводятся данные о том, что увеличение активации PI-3/Akt и/или ERK путей приводит к усилению экспрессии XIAP [Keramati A.R., 2008].

Другой антиапоптотический белок, участвующий в модулировании активации каспаз, Aven впервые был выявлен при изучении инсультов. Он ингибировал апоптоз нервных клеток линии FL5.12 [Chau B.N. et al., 2000].

Ген Aven локализован в 13 регионе длинного плеча 15 хромосомы и кодирует белок, состоящий из 362 аминокислотных остатков. Показано, что Aven экспрессируется во всех тканях человека, но наибольшая его экспрессия была выявлена в сердце, скелетных мышцах, почках, печени, поджелудочной железе и яичках [Kutuk O. et al., 2010].

Aven способен образовывать комплексы с Araf-1. В результате ингибируется самоассоциация и ухудшается олигомеризация Araf-1, требуемая для активации каспазы-9. Aven ингибирует активность каспаз в бесклеточных экстрактах и подавляет апоптоз, индуцированный комплексом Araf-1/каспаза-9 [Chau B.N. et al., 2000].

Позднее было обнаружено, что Aven имеет область связывания с ВН-1 доменом белка Bcl-XL. Мутация в ВН-1 домене (mt7) приводит к инактивации антиапоптотической функции Bcl-XL и отменяет связывание с Aven. Стоит отметить, что Bcl-xL является необходимым для антисуицидальной активности Aven, и истощение белка Bcl-XL отменяет Aven-опосредованную защиту от апоптоза [Figueroa B.Jr., 2004]. Показано

также, что Aven, связываясь с Bcl-xL, усиливает антиапоптотические свойства последнего в ответ на каспаза-1-индуцированный апоптоз [Chau V.N. et al., 2000].

Имеются данные о том, что Aven является важным посредником в ходе апоптоза, индуцированного повреждением ДНК, посредством запуска ареста клеточного цикла через активацию АТМ (ataxia-telangiectasia-mutated) киназы в клетках рака молочной железы, нарушение его ядерной экспрессии может способствовать нестабильности генома в опухолевых клетках [Gross A., 2008]. Показано, что гиперэкспрессия Aven ассоциирована с неблагоприятным прогнозом острой лимфобластной лейкемии [Paydas S., 2003].

Таким образом, даже после активации каспазы-3 процесс апоптоза может быть abortирован за счет действия белков-ингибиторов каспаз, однако точные сигнальные пути и их индукторы остаются до конца неясными. Кроме того, данные литературы об эффектах внутриклеточных газовых трансмиттеров на указанные белки отсутствуют вовсе.

### **1.2.3. Нарушения апоптоза и внутриклеточной газовой коммуникации при опухолевом росте**

Снижение интенсивности клеточной гибели может приводить к развитию злокачественных новообразований. Показано, что газовые трансмиттеры играют двойную роль в регуляции апоптоза в опухолевых клетках. Они либо направляют клетки на апоптоз, либо защищают их от проапоптотической индукции [Olson S.Y., 2008]. Так, в солидных опухолях, сопровождающихся усиленным ростом микрососудов, плотность которых коррелирует с прогрессией опухолей, выявлена высокая экспрессия NO-синтазы (NOS). Высокая активность всех трех изоформ NOS обнаружена в опухолях головного мозга глиальной природы [Choudhari S.K., 2013]. Прогрессия этих опухолей ассоциирована как со степенью анаплазии, так и с ангиогенезом и повышенной проницаемостью сосудов опухоли, что

свидетельствует в пользу гипотезы о прямом участии гиперпродукции NO в васкуляризации опухолей мозга. Известен эффект оксида азота при сочетанном использовании с противоопухолевыми препаратами. Так, было показано, что доноры NO способны повышать терапевтическую эффективность доксорубина [Кондакова И.В., 2005]. По данным Н.П. Коноваловой [Коновалова Н.П., 2003], использование доноров оксида азота повышало эффективность цитостатической терапии экспериментальных опухолей цисплатиной, циклофосфаном.

В различных исследованиях продемонстрирована 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]. Однако существуют работы, показывающие, что окись азота - важный компонент противоопухолевого иммунитета. Например, увеличение экспрессии iNOS является защитной реакцией организма при раке толстой кишки у мышей [Zhang R., Ma A., 2007].

Показано, что экспрессия NO-1 увеличивалась в опухолях, по сравнению с окружающими здоровыми тканями. Это было продемонстрировано для лимфосаркомы, аденокарциномы, гепатомы, глиобластомы, меланомы, рака предстательной железы, саркомы Капоши, плоскоклеточного рака, рака поджелудочной железы и при опухолях головного мозга [Jozkowicz A., Was H., 2007]. Большая часть клеток хронической миелоидной лейкемии экспрессировали NO-1 и химерный белок BCR/ABL, являющийся регулятором экспрессии NO-1. NO-1 очень часто активирована в быстро делящихся клетках эпителия и клетках растущих опухолей [Maines M.D., 1996]. Интересно, что было показано влияние NO-1 на клеточный цикл, хотя последствия данного влияния незначительны и могут быть противоположны в разных тканях. Существует мнение, что p21 является белком-посредником NO-1-зависимого торможения пролиферации. При этом повышение активности NO-1 связано с усилением экспрессии p21. Это было выявлено в эпителиальных клетках, сосудистых гладкомышечных

клетках, клетках папиллярной карциномы щитовидной железы и клеточной линии рака желудка [Jozkowicz A., Was H., 2007]. Однако для некоторых клеточных моделей продемонстрировано антипролиферативное действие HO-1. CO может стимулировать p38 за счет индукции sGC и повышения цГМФ. Активация или повышение экспрессии p38 MAPK может привести к аресту клеточного цикла и преждевременному старению клеток [Jozkowicz A., Was H., 2007].

Многочисленные исследования убедительно показали, что HO-1 является цитопротекторным и антиапоптотическим ферментом в опухолевых клетках при окислительном стрессе, гипоксии, лишении сыворотки или токсичных соединений [Jozkowicz A., Was H., 2007]. В клеточной линии рака толстой кишки гемоксигеназа-1 вызывала активацию Akt, что сопровождалось увеличением соотношения Bcl-2/Bax [Busserolles J., 2006]. Повышение активности HO-1 может быть связано с увеличением содержания IAP-2 и снижением активности каспазы-3 в раковых клетках желудка [Liu ZM., 2004].

Существует предположение, что H<sub>2</sub>S бактериального происхождения может вносить свой вклад в возникновение болезней кишечника, и, в частности, язвенного колита и колоректального рака [Huyske M.M., Gaskins H.R., 2004]. Позднее было показано, что сульфид водорода защищает клетки колоректального рака *in vitro* от апоптоза, индуцированного β-фенилэтилизотиоцианатом [Rose P., Moore P.K., 2005]. В работах A. Parapetropoulos [2009] показано, что сульфид водорода является эндогенным стимулятором ангиогенеза в различных типах опухолевых клеток.

Таким образом, модуляция внутриклеточной газовой коммуникации неоднозначно влияет на опухолевую прогрессию, метастазирование и инвазию. Точный эффект может зависеть от типа опухолевого процесса и его локализации, что и требует дальнейшего изучения.

## Заключение

К настоящему времени, несмотря на интенсивные исследования роли внутриклеточных газовых транмиттеров в реализации апоптоза, не существует детальной картины данного процесса. Различные механизмы, активирующие или подавляющие клеточную гибель, тесно связаны между собой, и зачастую трудно выделить про- или антиапоптотическое влияние газообразных мессенджеров. На сегодняшний день накоплено одинаковое количество фактических данных, свидетельствующих как о протективных, так и о цитотоксических эффектах оксида азота, сульфида водорода и монооксида углерода, иногда противоречащих друг другу. В ряде работ продемонстрирована антиапоптотическая роль газовых транмиттеров: нитрозилирование каспазы-3 приводит к подавлению развития внутреннего пути активации апоптоза, оксид углерода препятствует TNF-индуцированному апоптозу мышинных фибробластов, а сульфид водорода ингибирует апоптоз изолированных нейтрофилов человека.

В последнее время всё больший научный интерес вызывают белки-ингибиторы каспаз, способные отменять апоптоз даже на самых поздних этапах. Появляется всё больше данных о том, что возможно именно указанные протеины вовлечены в антиапоптотический механизм действия внутриклеточных газовых транмиттеров.

По другим данным, увеличение внутриклеточного содержания оксида азота сопровождается стимулированием экспрессии гена p53 и является причиной гибели посредством апоптоза макрофагов. Оксид углерода способен активировать проапоптотический белок FADD и каспазы-8, -9 и -3, а также снижать экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2. Данные события сопровождаются активацией ERK MAP киназы. Обработка клеток поджелудочной железы H<sub>2</sub>S способна активировать фосфорилирование киназ MAP-сигнального каскада и, в результате, активировать апоптоз.

На сегодняшний день несомненна роль MAP киназ в трансдукции сигнала апоптоза в клетках, однако взаимодействие с системой

внутриклеточной газовой сигнализации остается неясным. Общая картина, демонстрирующая место газовых транзиттеров в молекулярных механизмах реализации апоптоза, может быть представлена в виде схемы (рис. 3).

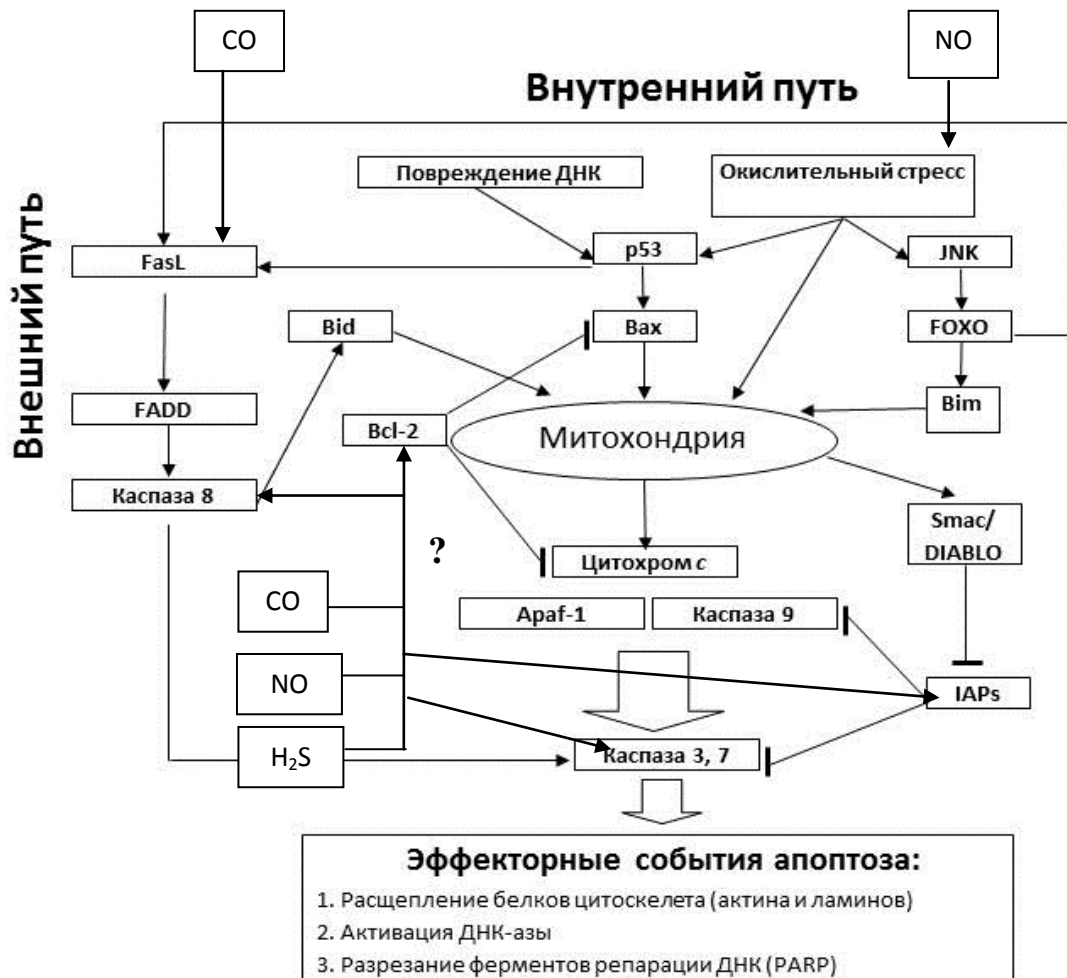


Рис. 3. Место внутриклеточных газовых транзиттеров в молекулярных путях апоптоза (по данным R.Wang, [2012]).

Примечание: ? – данные отсутствуют, → - стимуляция, ⊣ - ингибирование.

Таким образом, в настоящее время перед фундаментальной наукой остро стоит задача разработки и внедрения новых высокотехнологичных патогенетически обоснованных подходов к коррекции изменений, сопровождающих опухолевотрансформированные клетки. Поиск молекулярных специфических маркеров опухолевого перерождения является необходимым элементом разработки современных подходов к лечению и профилактике злокачественных новообразований, осуществляемых на

клеточном и молекулярном уровнях. Исследования последних лет показали, что развитие опухолей становится возможным только в результате совокупного нарушения работы ряда систем, регулирующих пролиферацию, апоптоз, дифференцировку клеток, противоопухолевый иммунитет. При этом особый интерес исследователей вызывает изучение молекулярных механизмов дизрегуляции клеточного цикла и апоптоза. В настоящее время определены ключевые эффекторные мишени, опосредующие клеточную гибель и смену фаз клеточного цикла. Нерешенным остался вопрос о том, на уровне каких регуляторных молекул происходит переключение сигнала гибели в сигнал пролиферации. В центре внимания исследователей находятся также вопросы, касающиеся механизмов внутриклеточной трансдукции сигналов, в том числе обусловленные газовыми посредниками - оксидом азота, окисью углерода и сульфидом водорода. Определена решающая роль указанных молекул в регуляции тонуса сосудов, передаче нервного импульса, показано их кардиопротективное действие. Однако сведения о роли внутриклеточных газовых транзиттеров в регуляции процессов апоптоза и пролиферации клеток носят противоречивый характер. Таким образом, предпринятое нами исследование позволит дополнить имеющиеся на сегодняшний день знания о месте и роли внутриклеточных газовых транзиттеров в патогенезе опухолевой трансформации, а также определить возможные молекулярные маркеры и новые подходы к патогенетически обоснованной коррекции изменений, сопровождающих опухолевую трансформацию клеток.

## Глава 2. Материал и методы исследования

### 2.1. Материал исследования

В работе использовалась клеточная линия Jurkat, полученная из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Данная клеточная линия является иммортализованной линией Т-лимфоцитов человека и была выделена в конце 1970-х из периферической крови 14-ти летнего больного Т-лимфобластной лейкемией. Способ культивирования линии – суспензионный, оптимальная плотность посева -  $3,0-9,0 \cdot 10^5$  клеток/мл. Для данной клеточной линии Институтом цитологии РАН был проведен контроль контаминации на бактерии, грибы и микоплазмы, 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%. Для данной линии также характерен синтез интерлейкина-2 и экспрессия Т-клеточного маркера CD3.

В клиническое исследование были включены 26 здоровых доноров в возрасте от 18 до 40 лет (мужчины - 10, женщины - 16). Критериями исключения из исследования являлись: возраст моложе 18 и старше 40 лет; период обострения хронических воспалительных заболеваний; онкологические, аутоиммунные, наследственные и психические болезни, алкогольная и наркотическая зависимости. Материалом для исследования служила венозная кровь, взятая утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл и стабилизированная К<sub>3</sub>ЭДТА. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете (№1275 от 01.03.10г.)

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



Для изучения роли внутриклеточных газовых транмиттеров в реализации физиологических функций и патологических процессов используются различные активаторы внутриклеточной продукции и доноры данных молекул. Более целесообразным является применение последних, так как внутриклеточная концентрация газотранмиттера изменяется эквимолярно добавленному донору.

В качестве доноров оксида азота были выбраны нитропруссид натрия (SNP) и 3-(аминопропил)-1-гидрокси-3-изопропил-2-оксо-1-триазин (NOC-5) (рис. 4).

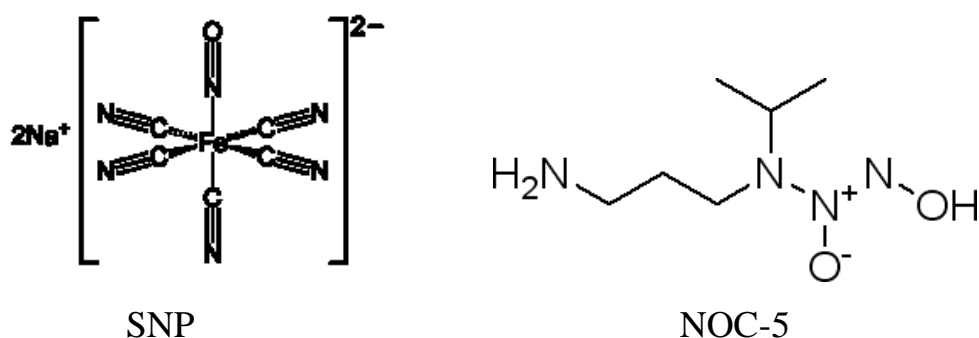


Рис. 4. Химическая структура SNP и NOC-5

Оба способны распадаться с выделением оксида азота, который, благодаря своим липофильным свойствам, быстро проникает внутрь клетки к белкам-мишеням [Zabalgoitia M., 2008]. Однако SNP использовался нами для воспроизведения воздействия миллимолярных (100 мМ) концентраций оксида азота, в которых он действует как окислитель и способен образовывать активные формы кислорода. Кроме того, имеются данные, что нитропруссид натрия способен высвободить циано-группы. Специфический донор оксида азота NOC-5 использовался в микромолярных (100 мкМ) концентрациях, затрагивающих сигнальные внутриклеточные системы, а также служил доказательством ведущей роли оксида азота в продемонстрированных нами изменениях апоптотической реакции.

В качестве донора  $\text{H}_2\text{S}$  обычно используется гидросульфид натрия (NaHS), способный к диссоциации на ионы  $\text{Na}^+$  и  $\text{HS}^-$ . Последний затем связывает протон с формированием недиссоциированного сульфида

водорода. Подобно NO и CO, H<sub>2</sub>S является липофильным и свободно проходит через плазматические мембраны. В физиологических условиях, то есть в водной среде и при pH=7,4, одна треть H<sub>2</sub>S остается недиссоциированной, две трети диссоциируют на H<sup>+</sup> и HS<sup>-</sup> (ион гидросульфида), который впоследствии может разложиться на H<sup>+</sup> и ион сульфида (S<sup>2-</sup>). Однако последняя реакция происходит только при высоком pH, таким образом, содержание S<sup>2-</sup> не превышает в естественных условиях токсические количества [Lowicka E., 2007].

На сегодняшний день существует несколько потенциальных доноров монооксида углерода: CO-RM (CO-высвобождающие молекулы), группа соединений, являющихся донорами монооксида углерода и выделяющие CO в клетках. Именно они являются самым значимым инструментом для изучения фармакологических эффектов указанного газа и выявления механизмов его действия (рис. 5).

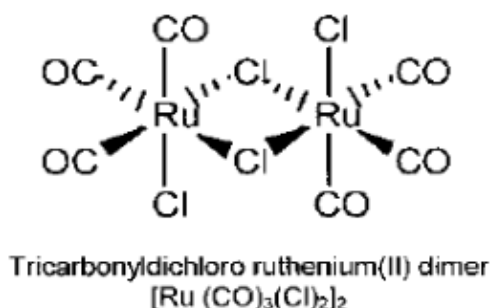


Рис. 5. Химическая структура CORM-2

CORM-1 ([Mn<sub>2</sub>(CO)<sub>10</sub>]) и CORM-2 (Ru(CO)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub> димер) являются липофильными соединениями и обладают биологическими эффектами, напрямую связанными с освобождением CO. CORM-3 и CORM-4 являются водорастворимыми донорами CO и не способны проникать через мембрану клетки. В своей работе мы использовали CORM-2, обладающий не только липофильностью, но и способностью быстро диссоциировать с образованием монооксида углерода [Hidaka A., 2010].

Нами в экспериментальных условиях были определены оптимальное время воздействия и оптимальная концентрация доноров внутриклеточных газовых трансмиттеров, необходимые для индукции апоптоза клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов. Для этого клеточную культуру Jurkat и выделенные мононуклеарные лейкоциты культивировали в стерильных 96-ти луночных круглодонных иммунологических планшетах. В лунки планшетов вносили суспензию клеток, доводили полной питательной средой (стр. 53) до концентрации  $1 \cdot 10^6$ /мл и добавляли доноры исследуемых газовых трансмиттеров. Конечная концентрация CORM-2 и NOC-5 составляла 5, 50, 100 и 500 мкМ; SNP и NaHS – 10, 50, 100, 500, 1000 мМ. Указанные концентрации являются, по данным литературы, оптимальными для моделирования влияния газовых трансмиттеров на внутриклеточные процессы [Chen X., 2004; Zabalgoitia M., 2008; Hidaka A., 2010]. Концентрация доноров внутриклеточных газовых трансмиттеров выше 1 М не использовалась, поскольку вызывала появление большого числа 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% CO<sub>2</sub>.

Далее, для выяснения роли p38 MAP-киназы в механизмах действия внутриклеточных газовых трансмиттеров, нами была подобрана доза химического ингибитора данной киназы. Для этого к клеточной линии и выделенным мононуклеарным лейкоцитам крови добавляли селективный ингибитор p38 MAP-киназы SB 203580 в концентрациях 0,0265, 0,265 и 2,65 мкМ и инкубировали в течение 30 мин. По данным литературы, указанные условия культивирования вызывают ингибирование активности p38 MAP-киназы на 80-95% [Saklatvala J., 1996].

## 2.2. Методы исследования

В соответствии с поставленной целью и задачами исследования нами был предложен алгоритм, предполагающий разделение работы на два

последовательных этапа. Кроме того, были сформированы три модели. Первая модель, основанная на применении двух доноров оксида азота, позволяла выявить вклад последнего в молекулярные механизмы апоптоза клеток линии Jurkat. Использование доноров, способных повышать внутриклеточное содержание оксида азота в разных степенях, позволяло судить о дозозависимости полученных эффектов и их специфичности. Вторая и третья модели дали возможность воспроизвести клеточную реакцию на повышение внутриклеточной концентрации сульфида водорода и монооксида углерода, соответственно. Все три модели были дополнены применением селективного химического ингибитора p38 MAPK для выявления вклада указанной киназы в изучаемые молекулярные механизмы.

На первом этапе исследования проводили оценку выраженности некротических и апоптотических изменений клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, в условиях экспериментального повышения внутриклеточной концентрации газовых транмиттеров. Для этого идентифицировали фосфатидилсерин на клеточной мембране, а также определяли активность каспазы-3 и -9.

На втором этапе исследования изучали молекулярные p38-зависимые и p38-независимые мишени действия газовых транмиттеров. Для этого оценивали экспрессию генов белков-ингибиторов каспаз (xIAP, AVEN) и белков-регуляторов апоптоза (bcl-2, bcl-x<sub>L</sub>, вах и bad). Затем определяли наличие в цитоплазме клеток белковых продуктов xIAP, AVEN, а также Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bad (табл.3). Для изучения состояния рецепторного пути активации апоптоза в условиях изменения внутриклеточной концентрации газовых посредников оценивали презентацию на мембранах клеток рецепторов к TNF- $\alpha$ , а также продукцию данного цитокина. Оценку состояния митохондриального пути проводили на основании изменения количества клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом. Результаты проведенного исследования подвергали статистической обработке.

Таблица 3

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

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 <sub>L</sub> ) 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 мРНК генов bad, bax, bcl-2, bcl-x <sub>L</sub> , 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 $\alpha$ в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов 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

### **2.2.1. Культивирование клеток линии Jurkat in vitro**

T-лимфобластные клетки человека линии Jurkat (Всероссийский банк клеточных культур, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург) были культивированы в RPMI-1640 («Invitrogen», США), дополненной в соотношении 9:1 эмбриональной телячьей сывороткой («Gibco Invitrogen», США), 0,3 мг/мл L- глутамином и 100 мкг/мл гентамицином в 5% CO<sub>2</sub> атмосфере при 37<sup>0</sup>С, с оптимальной плотностью 1\*10<sup>6</sup> 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 клеток оценивали по содержанию «мертвых» клеток, окрашенных в синий цвет. Доля погибших клеток, содержащих краситель, не превышала 5%. Криоконсервация проводилась в ростовой среде, дополненной 10% DMSO с плотностью 3,0-4,0\*10<sup>6</sup> клеток/мл в криотубах. Жизнеспособность клеток после криоконсервации составляла 90% (окраска трипановым синим на нулевом пассаже).

### **2.2.2. Выделение и культивирование мононуклеарных лейкоцитов крови**

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

Венозную кровь, стабилизированную K<sub>3</sub>ЭДТА в соотношении 2:1, наслаивали на градиент плотности Ficoll-Paque ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>) («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.

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

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

Выделенные на градиенте плотности мононуклеарные 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 мононуклеарных лейкоцитов разбавляли полной питательной средой до получения  $1 \cdot 10^6$  клеток в 1 мл среды.

### **2.2.3. Оценка количества апоптотически и некротически измененных клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов крови с использованием метода проточной лазерной цитофлуориметрии**

Для оценки реализации апоптоза мононуклеарных лейкоцитов и клеток линии Jurkat использовали ФИТЦ-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  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего буфера. Затем добавляли 1 мкл FITC-меченных AnnexinV-антител и 10 мкл пропидия йодида, после 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 – ФИТЦ – 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).

Полученные результаты выражали в процентах (число клеток, связавших аннексин V на поверхности мембраны, а также количество клеток, окрашенных пропидий йодидом).

#### **2.2.4. Оценка митохондриального трансмембранного потенциала мононуклеарных лейкоцитов крови и клеток линии Jurkat**

Количество клеток со сниженным уровнем потенциала митохондриальных мембран ( $\Delta\psi$ ) определяли с использованием набора реагентов «MitoScreen» («BD Pharmigen», 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<sup>0</sup> С, после чего клетки дважды отмывали буфером. Окрашенные JC-1 клетки анализировали на проточном цитометре FACS CantoII («Becton-Dickinson», 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).

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

#### **2.2.5. Оценка количества TNF R1-позитивных клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов крови**

Содержание клеток, презентующих на своей поверхности мембранную форму рецептора к фактору некроза опухоли- $\alpha$  1-го типа TNF-R1 (CD120), в клетках линии Jurkat и культурах мононуклеарных лейкоцитов крови определяли методом лазерной проточной цитофлуориметрии.

После культивирования клетки отмывали фосфатно-солевым буфером и окрашивали стандартными моноклональными антителами к данному рецептору, мечеными 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.

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

### 2.2.6. Оценка продукции TNF- $\alpha$ клетками линии Jurkat и мононуклеарными лейкоцитами крови

Определение концентрации TNF- $\alpha$  проводили в супернатантах культур клеток линии Jurkat и культур интактных мононуклеарных лейкоцитов после воздействия на них донорами исследуемых газовых трансмиттеров и ингибитором p38 MAP киназы. Для изучения уровня продукции TNF- $\alpha$  клетками пробирки со взвесью центрифугировали 10 мин при 900g, супернатант собирали и проводили количественное определение уровня TNF- $\alpha$  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<sup>0</sup>С при непрерывном встряхивании. После нескольких циклов промывки в каждую ячейку добавляли по 100 мкл раствора вторичных антител и проводили часовую инкубацию при 37<sup>0</sup>С. Промыв планшеты буфером и дистиллированной водой, в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена и инкубировали 30 мин при 37<sup>0</sup>С. 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-реагента.

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 продуктов жизнедеятельности клеток («0 доза») и стандартных растворов с

известной концентрацией. Результаты проведенного исследования выражали в пг/мл.

### **2.2.7. Оценка уровня мРНК генов белков-ингибиторов каспаз и белков-регуляторов апоптоза в клетках линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах крови**

Для количественного определения уровня мРНК генов *xIAP*, *AVEN*, *Bcl-2*, *Bcl-X<sub>L</sub>*, *Bax* и *Bad* использовали метод ПЦР в режиме реального времени. Данный метод позволяет отслеживать кинетику накопления продуктов амплификации исследуемых генов. В нашем случае это достигалось введением в реакцию смесь интеркалирующего 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 и мононуклеарных лейкоцитов крови 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  $\beta$ -меркаптоэтанола на 1 мл буфера, тщательно перемешивали пипетированием до полного удаления конгломератов клеток. Затем лизат центрифугировали 2 мин при 10000g на QIAshredder колонках. Далее добавляли этанол для улучшения связывания, и образец наносили на QIAmp колонки. Контаминанты удаляли, тотальную РНК элюировали в 30 мкл воды.

Оценку качества выделенного препарата РНК проводили по итогам электрофоретического разделения в 1,2% агарозном геле и буфере TAE (40 мМ Трис-уксусная кислота, 1мМ ЭДТА (pH=8,0)). Чистоту всех тестируемых

образцов тотальной РНК оценивали по наличию в агарозном геле электрофорезе 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 кДНК 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 ( $\text{N}_9$ ) (праймера, подобранного к среднестатистической последовательности ДНК), 10 мкл RT-буфера (20 мМ Tris-HCl ( $\text{pH}=8,3$ ), 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ DTT, 100 мМ KCl, 0,4 мМ 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 кДНК 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 включал первичную денатурацию – 3 мин при  $94^{\circ}\text{C}$ ; амплификационный цикл (x 40): денатурация – 6 сек при  $94^{\circ}\text{C}$ , отжиг праймеров – 6 сек при  $60^{\circ}\text{C}$ , элонгация – 6 сек при  $72^{\circ}\text{C}$ , съем сигнала – 10 сек при температуре плавления продукта амплификации (определялась индивидуально для каждой пары праймеров, при анализе кривой плавления) (рис. 6); построение кривой плавления – нагревание амплификационной

смеси с 60 до 95°C, с шагом 0,5°C, сопровождающиеся съемом флуоресцентного сигнала на каждом шаге в течение 10 сек (рис. 7)

Праймеры, позволяющие специфично амплифицировать фрагменты кДНК генов, представлены в таблице 4.

Таблица 4

## Структура специфических праймеров

Ген	Праймеры	Размер продукта, п.о.
aven	F: 5'-GATTTTCAGTGTCCCTCCTTAG-3'	253
	R: 5'-CCTTGCCATCATCAGTTCTC-3'	
x-iap	F: 5'-ATAGTGCCACGCAGTCTACAA-3'	101
	R: 5'-AGATGGCCTGTCTAAGGCAAA-3'	
bcl-2	F: 5'-CCTGTGGATGACTGAGTACCT-3'	132
	R: 5'-GCCAAACTGAGCAGAGTCTTC-3'	
bax	F: 5'-CGAACTGGACAGTAACATGGA-3'	142
	R: 5'-TGCTGGCAAAGTAGAAAAGG-3'	
bcl <sub>x1</sub>	F: 5'-TTACCTGAATGACCACCTAGAG-3'	98
	R: 5'-GCATTGTTCCCATAGAGTTCC-3'	
bad	F: 5'-GGATGAGTGACGAGTTTGTG-3'	106
	R: 5'-CCTGCCCAAGTTCCGATC-3'	
actb	F: 5'-CATTTCCGAAGCGAGTGTCT-3'	153
	R: 5'-GAGCGATTCCGGACTACCTT-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 2-х кратных разведений кДНК, каждая точка была представлена в двойном повторе. Качество реакции амплификации считалось приемлемым при выполнении следующих условий:

- разница между значениями Ct (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 2-х кратных разведений) и экспериментальными значениями была больше 0,95 ( $r^2 > 95$ );
- эффективность реакции амплификации более 90% ( $E > 90\%$ );
- специфичность реакции амплификации (подтверждалась по отсутствию дополнительных пиков на кривой плавления).

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.

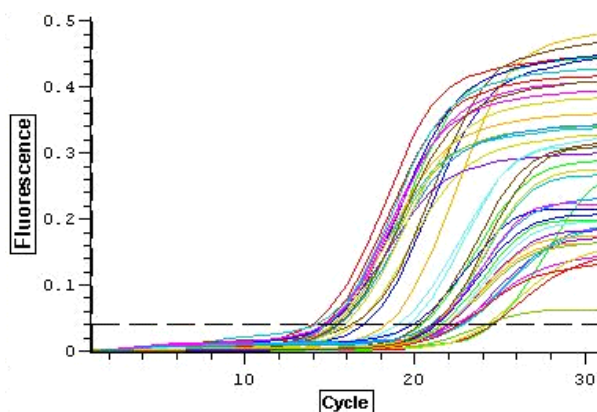


Рис. 6. Графическое представление кинетики накопления продукта ПЦР гена *bcl-2* и гена  *$\beta$ -actin* при амплификации экспериментальных образцов в логарифмических координатах. Каждый из образцов представлен в двух повторах

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

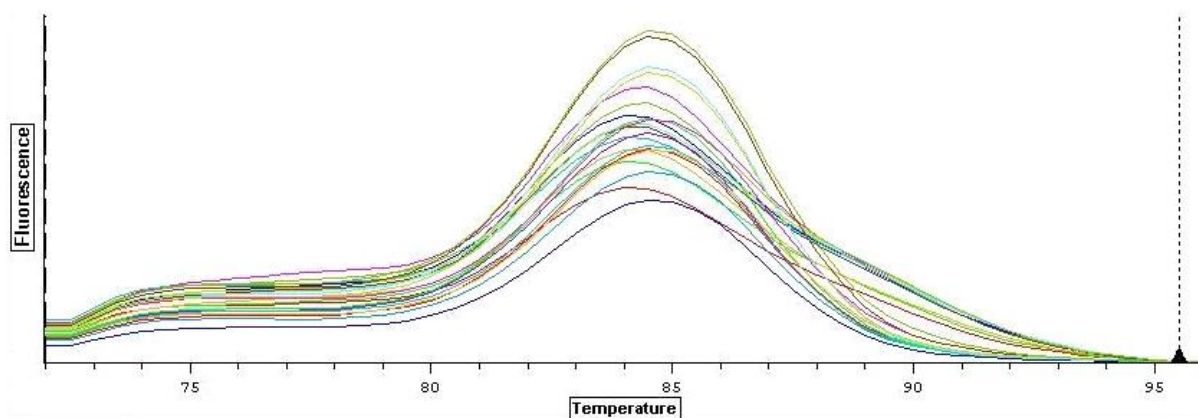


Рис. 7. Графическое представление кривой плавления продукта ПЦР гена *bcl-2* при амплификации экспериментальных образцов. Каждый из образцов представлен в двух повторах

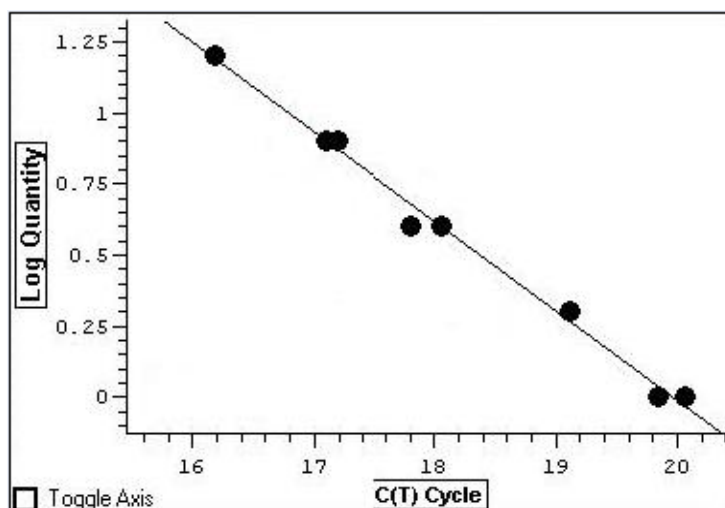


Рис. 8. Проекция значений *Ct* серии двукратных разведений для построения калибровочной кривой гена *bcl-2*

Амплификация каждой серии образцов сопровождалась постановкой контроля (пять точек в двойных повторах, каждая последующая точка представляла собой 2-х кратное разведение предыдущей) (рис. 8). Для определения относительного количества кДНК в образце использовали критерий *ddCt*. Результаты выражали в условных единицах (отношение относительного количества кДНК исследуемого гена к относительному количеству кДНК гена «домашнего хозяйства»).

### **2.2.8. Спектрофотометрическое определение активности каспазы-3 и -9 в клетках линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах крови**

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

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 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 принимали за единицу.

### **2.2.9. Оценка уровня белков-ингибиторов каспаз и белков-регуляторов апоптоза в клетках линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах крови**

Для определения содержания белков – ингибиторов каспаз (AVEN, XIAP) и белков – регуляторов апоптоза (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bad) – был использован метод вестерн-блоттинга. Метод 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 и мононуклеарные лейкоциты 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<sup>0</sup>С, 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).

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 осуществлялся электрофоретически в течение 1,5 ч при напряжении 10-15 В на дорожку. Нитроцеллюлозные блоты блокировали 1% желатином в фосфатно-солевом буфере и инкубировали 1 ч с первичными антителами к ключевым регуляторам апоптоза. Использовали антитела к белкам – ингибиторам каспаз (AVEN («Biosource», США), xIAP («Biosource», США)) и белкам – регуляторам апоптоза (Bcl-X<sub>L</sub> («Sigma», США), Bad («Biosource», США), Bcl-2 («Biosource», США)) в разведении 1:20000. Добавляли вторичные антитела с пероксидазной меткой («Biosource», США). Для визуализации результатов исследования использовали хемилюминесцентный 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. (отношение сигнала определяемого белка к сигналу белка глицеро-3-фосфат-дегидрогеназы в исследуемых образцах) [Dazard J.E., 2003].

### **2.2.10. Статистический анализ результатов**

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез [Лакин Г.Ф., 1980]. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для каждой выборки вычисляли средневывборочные характеристики: медиану, первый и третий квартили. Для оценки достоверности различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$  [Лакин Г.Ф., 1980].

### **Глава 3. Результаты собственных исследований**

Рядом авторов было показано, что внутриклеточные газовые трансмиттеры вносят вклад в реализацию суицидальной программы клеток [Wang R. и Wu L., 2005; Queiroga C.S.F., 2010], однако выбор между жизнью и смертью во многом зависит от типа клеток. Для изучения реакции различных типов клеток («нормальных» и бласт-трансформированных) на изменение внутриклеточной концентрации газовых трансмиттеров нами были проанализированы три модели, предполагающие изолированное воздействие соответствующих доноров NO, H<sub>2</sub>S и CO на молекулярные механизмы реализации запрограммированной клеточной гибели (ключевые эффекты и регуляторные молекулы реализации апоптоза).

#### **3.1. Особенности реализации запрограммированной гибели клеток в условиях изменения внутриклеточной концентрации оксида азота**

##### **3.1.1. Определение дозы и времени воздействия доноров оксида азота, индуцирующих модуляцию апоптоза клеток**

В нашей работе был использован донор оксида азота – нитропруссид натрия (SNP). В первую очередь, была определена цитотоксичность указанного соединения для нормальных и бласт-трансформированных клеток. Для этого мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров, и клетки линии Jurkat культивировали в течение 15 мин и 24 ч с 10, 50, 100 и 500 мМ SNP.

Культивирование клеток линии Jurkat в среде, содержащей SNP в дозе 5, 50, 100, 500 мкМ и 1, 10, 50, 100 мМ, в течение 15 мин не вызывало достоверных изменений количества клеток, гибнущих посредством некроза, по сравнению с интактной культурой (табл. 5). При добавлении 500 мМ SNP доля некротически измененных клеток составляла 78,50(74,50-82,50)%, что достоверно превышало значения показателя в интактной культуре и не могло использоваться в качестве экспериментальной дозы.

Таблица 5

Количество клеток с некротическими признаками в условиях повышения внутриклеточной концентрации оксида азота, Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>), n=4

Условия культивирования	Число клеток линии Jurkat с некротическими признаками, %		Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими признаками, %	
	После 15 мин инкубации	После 24 ч инкубации	После 15 мин инкубации	После 24 ч инкубации
Интактные клетки	0,35 (0,15-0,45)	0 (0-0,15)	0,50 (0-0,10)	0,45 (0,35-0,75)
Клетки после воздействия 5 мкМ SNP	0,20 (0,10-0,30) p <sub>1</sub> >0,05	4,00 (2,90-4,90) p <sub>1</sub> <0,05	0,05 (0-0,10) p <sub>2</sub> >0,05	3,30 (3,10-3,40) p <sub>2</sub> <0,05
Клетки после воздействия 50 мкМ SNP	0,20 (0,10-0,30) p <sub>1</sub> >0,05	6,80 (4,70-8,00) p <sub>1</sub> <0,05	0,05 (0-0,10) p <sub>2</sub> >0,05	4,50 (3,10-5,20) p <sub>2</sub> <0,05
Клетки после воздействия 100 мкМ SNP	0,60 (0,40-0,70) p <sub>1</sub> >0,05	3,70 (3,50-3,90) p <sub>1</sub> <0,05	0,05 (0-0,10) p <sub>2</sub> >0,05	4,30 (4,20-4,60) p <sub>2</sub> <0,05
Клетки после воздействия 500 мкМ SNP	0,40 (0,20-0,50) p <sub>1</sub> >0,05	4,60 (3,50-5,60) p <sub>1</sub> <0,05	0,05 (0-0,10) p <sub>2</sub> >0,05	5,30 (5,00-5,50) p <sub>2</sub> <0,05
Клетки после воздействия 1 мМ SNP	0,50 (0,40-0,60) p <sub>1</sub> >0,05	7,80 (3,40-8,80) p <sub>1</sub> <0,05	0,05 (0-0,10) p <sub>2</sub> >0,05	4,90 (4,10-5,90) p <sub>2</sub> <0,05
Клетки после воздействия 10 мМ SNP	0,30 (0,20-0,40) p <sub>1</sub> >0,05	73,45 (69,40-88,45) p <sub>1</sub> <0,05	0,05 (0-0,10) p <sub>2</sub> >0,05	71,65 (65,15-81,35) p <sub>2</sub> <0,05
Клетки после воздействия 50 мМ SNP	0,20 (0,20-0,90) p <sub>1</sub> >0,05	93,17 (93,17-100,00) p <sub>1</sub> <0,05	0 (0-0) p <sub>2</sub> >0,05	71,60 (64,65-73,95) p <sub>2</sub> <0,05
Клетки после воздействия 100 мМ SNP	0,40 (0,30-1,30) p <sub>1</sub> >0,05	97,70 (97,70-100,00) p <sub>1</sub> <0,05	0 (0-0) p <sub>2</sub> >0,05	80,75 (73,65-87,05) p <sub>2</sub> <0,05
Клетки после воздействия 500 мМ SNP	78,50 (74,50-82,50) p <sub>1</sub> <0,05	100,00 (100,00-100,00) p <sub>1</sub> <0,05	92,30 (89,10-95,50) p <sub>2</sub> <0,05	100,00 (100,00-100,00) p <sub>2</sub> <0,05

Примечание (здесь и в табл. 6-8): p<sub>1</sub> - достоверность различий по сравнению с интактной культурой линии Jurkat; p<sub>2</sub> - достоверность различий по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров, n-кол-во экспериментов

Аналогичные изменения были зафиксированы и в культуре мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров; действие SNP в дозах 5, 50, 100, 500 мкМ, а также 1, 10, 50, 100 мМ достоверных изменений не вызывало (табл. 5); тогда как в дозе 500 мМ SNP приводило к некрозу 92,30(89,10-95,50)% клеток относительно контроля.

Увеличение продолжительности действия SNP в дозе 5-1000 мкМ до 24 ч на клетки как линии Jurkat, так и на мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров, приводило к достоверному увеличению доли некротически измененных клеток; при этом действие SNP в более высоких дозах (10-500 мМ) вызывало повышение количества клеток с некротическими признаками, превышающее 50% (табл. 5). Далее для выяснения влияния SNP на программированную гибель клеток нами был проведен аннексиновый тест (табл. 6).

Таблица 6

Количество клеток с апоптотическими признаками в условиях повышения внутриклеточной концентрации оксида азота, Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>), n=4

Условия культивирования	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками, %		Число мононуклеарных лейкоцитов с апоптотическими признаками, %	
	После 15 мин инкубации	После 24 ч инкубации	После 15 мин инкубации	После 24 ч инкубации
Интактные клетки	3,50 (2,70-4,20)	1,05 (0-1,55)	32,20 (18,80-35,40)	28,50 (24,85-29,30)
Клетки после воздействия 5 мкМ SNP	2,80 (1,50-3,40) p <sub>1</sub> >0,05	1,20 (0,90-2,00) p <sub>1</sub> >0,05	25,60 (23,60-26,70) p <sub>2</sub> >0,05	23,70 (21,40-26,90) p <sub>2</sub> >0,05
Клетки после воздействия 50 мкМ SNP	4,20 (4,00-5,50) p <sub>1</sub> >0,05	1,50 (0,50-1,80) p <sub>1</sub> >0,05	29,90 (21,00-38,80) p <sub>2</sub> >0,05	30,50 (29,00-31,50) p <sub>2</sub> >0,05
Клетки после воздействия 100 мкМ SNP	5,50 (1,70-5,90) p <sub>1</sub> >0,05	2,30 (1,50-2,50) p <sub>1</sub> >0,05	24,30 (13,70-30,50) p <sub>2</sub> >0,05	27,40 (25,50-29,30) p <sub>2</sub> >0,05
Клетки после воздействия 500 мкМ SNP	5,80 (4,20-5,60) p <sub>1</sub> >0,05	8,90 (7,20-9,60) p <sub>1</sub> <0,05	25,40 (18,70-26,00) p <sub>2</sub> >0,05	35,50 (28,20-36,50) p <sub>2</sub> >0,05
Клетки после воздействия 1 мМ SNP	7,85 (3,60-8,90) p <sub>1</sub> >0,05	9,40 (8,60-10,00) p <sub>1</sub> <0,05	26,90 (24,10-31,80) p <sub>2</sub> >0,05	26,80 (24,40-28,30) p <sub>2</sub> >0,05
Клетки после воздействия 10 мМ SNP	5,80 (3,45-8,50) p <sub>1</sub> >0,05	0,40 (0-0,90) p <sub>1</sub> >0,05	35,60 (24,60-36,60) p <sub>2</sub> >0,05	12,30 (8,95-15,55) p <sub>2</sub> <0,05
Клетки после воздействия 50 мМ SNP	14,05 (7,85-18,00) p <sub>1</sub> <0,05	0,30 (0-0,60) p <sub>1</sub> >0,05	24,90 (21,90-31,60) p <sub>2</sub> >0,05	5,85 (4,75-6,65) p <sub>2</sub> <0,05
Клетки после воздействия 100 мМ SNP	16,95 (14,15-21,80) p <sub>1</sub> <0,05	1,19 (1,17-1,21) p <sub>1</sub> >0,05	25,30 (22,70-30,80) p <sub>2</sub> >0,05	3,30 (2,75-4,60) p <sub>2</sub> <0,05

При исследовании влияния оксида азота 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 мМ до 14,05 (7,85-18,00)% и 100 мМ - до 16,95 (14,15-21,80)%, что достоверно превышало аналогичный показатель в контроле - 3,50 (2,70-4,20)% ( $p < 0,05$ ). Воздействие на клетки SNP в дозе 5, 50, 100, 500 мкМ, а также 1 и 10 мМ не сопровождалось интенсификацией апоптотической гибели клеток Т-лимфобластной лейкемии ( $p > 0,05$ ). Относительное содержание мононуклеарных лейкоцитов, вступивших на путь апоптотической гибели, после их инкубации с 5, 50, 100, 500 мкМ и 1, 10, 50, 100 мМ SNP в течение 15 мин достоверно не отличалось от соответствующего показателя в интактной культуре ( $p > 0,05$ ). Кроме того, нами было продемонстрировано, что воздействие оксида азота в концентрациях 5, 50, 100, 500 мкМ и 1, 10, 50, 100 мМ на клетки линии Jurkat в течение 24 ч не сопровождалось интенсификацией апоптотической гибели клеток ( $p > 0,05$ ), а инкубация клеток с SNP в дозах 500 мкМ и 1 мМ приводила к достоверному увеличению апоптотически измененных клеток до 8,90 (7,20-9,60)% и 9,40 (8,60-10,00)%, соответственно ( $p < 0,05$ ). Программированная гибель мононуклеарных лейкоцитов угнеталась при воздействии SNP в дозе 10 мМ - до 12,30 (8,95-15,55)%, в дозе 50 мМ - до 5,85 (4,75-6,65)%, в дозе 100 мМ SNP - до 3,30(2,75-4,60)% по сравнению с контролем 28,50(24,85-29,30)% ( $p < 0,05$ ) и не изменялась при действии донора оксида азота в дозах 5, 50, 100, 500 мкМ и 1мМ SNP ( $p > 0,05$ ). Подобное снижение может быть объяснено апоптотической гибелью клеток через 15 мин инкубации (табл. 6).

Рядом авторов выдвигается предположение, что, помимо оксида азота, нитропруссид натрия выделяет циан-группы, которые могут изменять клеточный ответ. Для подтверждения ведущей роли оксида азота в найденных изменениях мы протестировали клеточный ответ на действие другого донора оксида азота - NOC-5. В первую очередь, нами была оценена

цитотоксичность указанного соединения после воздействия его в течение 15 мин и 24 ч в концентрациях, равных 5, 50, 100, 500 мкМ и 1 мМ. Инкубирование клеток линии Jurkat в течение 15-ти мин в присутствии NOC-5 в указанных концентрациях не приводило к достоверным изменениям количества некротических клеток по сравнению с интактной клеточной культурой ( $p > 0,05$ ). Аналогичная реакция отмечалась и в культуре мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров ( $p > 0,05$ ) (табл. 7).

Таблица 7

Количество клеток с некротическими признаками в условиях повышения внутриклеточной концентрации оксида азота, Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>), n=4

Условия культивирования	Число клеток линии Jurkat с некротическими признаками, %		Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими признаками, %	
	После 15 мин инкубации	После 24 ч инкубации	После 15 мин инкубации	После 24 ч инкубации
Интактные клетки	0,35 (0,15-0,45)	0 (0-0,15)	0,05 (0-0,10)	0,05 (0-0,10)
Клетки после воздействия 5 мкМ NOC-5	0,20 (0,10-0,40) $p_1 > 0,05$	3,90 (3,20-4,00) $p_1 < 0,05$	0 (0-0,05) $p_2 > 0,05$	0,60 (0,40-0,90) $p_2 > 0,05$
Клетки после воздействия 50 мкМ NOC-5	0,20 (0,10-0,30) $p_1 > 0,05$	4,20 (4,10-4,40) $p_1 < 0,05$	0 (0-0,05) $p_2 > 0,05$	0,65 (0,50-0,80) $p_2 > 0,05$
Клетки после воздействия 100 мкМ NOC-5	0,30 (0,20-0,40) $p_1 > 0,05$	6,50 (6,10-6,60) $p_1 < 0,05$	0 (0-0,05) $p_2 > 0,05$	0,40 (0,30-0,80) $p_2 > 0,05$
Клетки после воздействия 500 мкМ NOC-5	0 (0-0,10) $p_1 > 0,05$	7,10 (6,80-7,90) $p_1 < 0,05$	0 (0-0,05) $p_2 > 0,05$	0,30 (0,10-0,40) $p_2 > 0,05$
Клетки после воздействия 1 мМ NOC-5	0 (0-0,10) $p_1 > 0,05$	11,00 (10,20-11,20) $p_1 < 0,05$	0 (0-0,10) $p_2 > 0,05$	0,10 (0-0,20) $p_2 > 0,05$

Удлинение времени инкубации клеток линии Jurkat с различными концентрациями NOC-5 до 24 ч продемонстрировало дозозависимое увеличение количества клеток с некротическими изменениями ( $p < 0,05$ ) (табл. 7). Культура мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, в аналогичных условиях на воздействие донора оксида азота повышением количества некротически измененных клеток не отвечала.

Следующим шагом проведенного нами исследования явилась оценка количества клеток, имеющих апоптотические признаки (табл. 8).

Таблица 8

Количество клеток с апоптотическими признаками в условиях повышения внутриклеточной концентрации оксида азота,  $Me(Q_1-Q_3)$ ,  $n=4$

Условия культивирования	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками, %		Число мононуклеарных лейкоцитов с апоптотическими признаками, %	
	После 15 мин инкубации	После 24 ч инкубации	После 15 мин инкубации	После 24 ч инкубации
Интактные клетки	3,50 (2,70-4,20)	1,05 (0-1,50)	32,20 (18,80-35,40)	28,50 (24,80-29,30)
Клетки после воздействия 5 мкМ NOC-5	4,00 (3,60-4,20) $p_1 > 0,05$	4,80 (4,50-5,10) $p_1 < 0,05$	34,60 (3,10-34,90) $p_2 > 0,05$	25,60 (23,40-28,90) $p_2 > 0,05$
Клетки после воздействия 50 мкМ NOC-5	3,20 (2,80-3,70) $p_1 > 0,05$	5,00 (4,10-5,80) $p_1 < 0,05$	37,10 (35,30-38,90) $p_2 > 0,05$	22,50 (20,40-23,00) $p_2 > 0,05$
Клетки после воздействия 100 мкМ NOC-5	3,90 (3,80-4,10) $p_1 > 0,05$	8,70 (8,50-8,80) $p_1 < 0,05$	37,40 (36,80-38,30) $p_2 > 0,05$	23,60 (21,90-29,80) $p_2 > 0,05$
Клетки после воздействия 500 мкМ NOC-5	2,70 (2,50-4,50) $p_1 > 0,05$	12,70 (10,30-13,00) $p_1 < 0,05$	34,30 (32,10-36,40) $p_2 > 0,05$	24,50 (23,50-25,60) $p_2 > 0,05$
Клетки после воздействия 1 мМ NOC-5	4,10 (4,00-4,20) $p_1 > 0,05$	12,90 (10,30-14,70) $p_1 < 0,05$	34,30 (32,10-36,80) $p_2 > 0,05$	39,00 (28,60-42,30) $p_2 > 0,05$

Воздействие на клетки линии Jurkat донора оксида азота в указанных выше дозах в течение 15-ти мин не приводило к достоверным изменениям количества клеток, имеющих апоптотические признаки, по сравнению с контролем ( $p > 0,05$ ). Инкубирование мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, не продемонстрировало изменения количества клеток с апоптотическими признаками при добавлении в культуральную среду NOC-5 в концентрациях 5, 50, 100, 500 и 1000 мкМ, по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). При инкубировании клеток линии Jurkat с NOC-5 в различных концентрациях в течение 24 ч нами было продемонстрировано дозозависимое увеличение количества клеток с апоптотическими признаками ( $p < 0,05$ ), по сравнению с контролем (табл. 8). Достоверных различий в количестве апоптотически измененных



мононуклеарных лейкоцитов при инкубировании в течение 24 ч с донором оксида азота исследованных дозах, по сравнению с контролем, выявлено не было ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, достоверное увеличение количества клеток линии Jurkat, экспрессирующих на своей поверхности фосфатидилсерин, происходило при 15-ти минутной инкубации с SNP в дозе 100 мМ и 24-х часовой инкубации с NOC-5 в дозе 100 мкМ (табл. 8). Указанные концентрации не вызывали достоверных изменений количества клеток, вступивших в некроз, а также не приводили к достоверному увеличению количества мононуклеарных лейкоцитов с некротическими и апоптотическими признаками. При этом, действие SNP в высоких дозах (100 мМ) вызывало апоптоз уже через 15 мин, в то время как воздействие его в низких концентрациях (100 мкМ) для потенцирования апоптоза требовала 24-х часовой инкубации.

Далее для идентификации молекулярных механизмов апоптогенного действия оксида азота использовались указанные выше время инкубации и концентрация SNP и NOC-5.

### **3.1.2. Закономерности вовлеченности p38 MAPK в регуляцию апоптотической реакции клеток при изменении внутриклеточной концентрации оксида азота**

Предполагаемым путем трансдукции сигнала с участием газовых трансмиттеров является система внутриклеточных киназ, одним из элементов которой является p38 MAP киназа. Для определения участия указанной киназы в регуляции апоптоза при изменении внутриклеточной концентрации газов нами был использован селективный химический ингибитор SB 203580. Клетки линии Jurkat инкубировались с SB 203580 в дозах 2,65, 0,265 и 0,0265 мкМ в течение 30 мин (табл. 9).

Таблица 9

Количество клеток с апоптотическими признаками в условиях ингибирования p38 MAP киназы, Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

Условия инкубации	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками после 30 мин инкубации, %
Интактные клетки линии Jurkat	5,1 (3,5-6,0)
Клетки после воздействия 2,65 мкМ SB 203580	36,3 (32,9-38,2) p<0,05
Клетки после воздействия 0,265 мкМ SB 203580	7,3 (6,2-8,6) p>0,05
Клетки после воздействия 0,0265 мкМ SB 203580	7,2 (6,5-8,4) p>0,05

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с интактной культурой линии Jurkat

Воздействие в течение 30 мин SB 203580 в дозе 2,65 мкМ на клетки линии Jurkat приводило к достоверному увеличению количества апоптотически измененных клеток [до 36,3(32,9-38,2)%] относительно интактной культуры [5,1(3,5-6,0)%, p<0,05], действие его в дозах равных 0,265 мкМ и 0,0265 мкМ достоверных изменений значений указанного параметра не вызывало [7,3(6,2-8,6)% и 7,2(6,5-8,4)%, соответственно, p>0,05]. Для дальнейшего изучения молекулярных механизмов реализации апоптоза нами была выбрана максимальная концентрация селективного ингибитора p38 MAPK, не вызывающая апоптоз клеток – 0,265 мкМ.

На следующем этапе нами была осуществлена проверка гипотезы о вовлеченности p38 MAPK в трансдукцию апоптогенного сигнала, опосредованного изменением внутриклеточного содержания оксида азота. Так, воздействие SNP в дозе 100 мМ и NOC-5 в дозе 100 мкМ на клетки линии Jurkat, предварительно обработанные SB 203580, приводило к снижению количества клеток, вступивших в апоптоз [5,50(4,40-6,70)% и 0,60(0,30-0,80)%, соответственно], по сравнению с культурой клеток,

обработанных только SNP и NOC-5 [(16,95(14,15-21,80)% и 8,70(8,50-8,80)%, соответственно,  $p < 0,05$ ] (рис. 9).

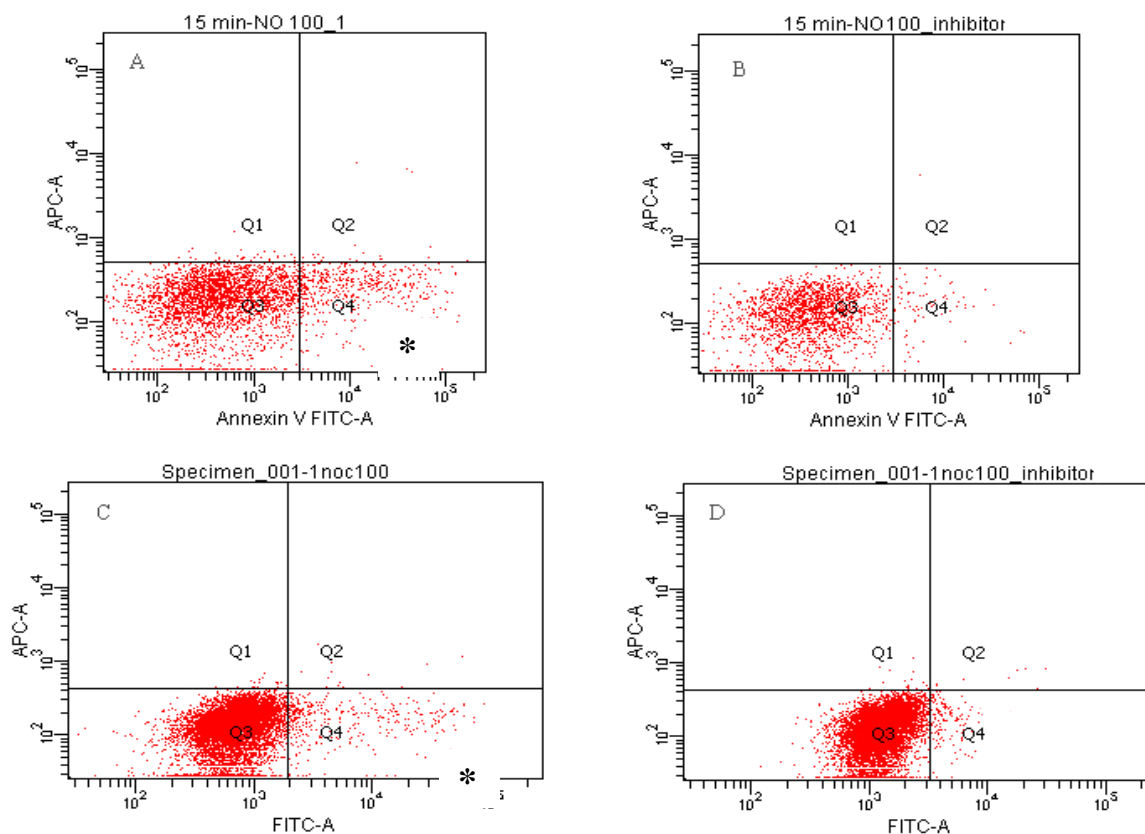


Рис. 9. Изменения количества аннексин-положительных (Q4) клеток линии Jurkat при: А – культивировании клеток со 100 мМ SNP; В – культивировании клеток с 0,265 мкМ SB 203580 и 100 мМ SNP; С – культивировании клеток со 100 мкМ NOC-5; D – культивировании клеток с 0,265 мкМ SB 203580 и 100 мкМ NOC-5  
\* - достоверность различий по сравнению с интактными клетками линии Jurkat

Таким образом, по итогам проведенного исследования было обнаружено, что препараты, выделяющие оксид азота опосредует свое апоптогенное действие посредством вовлечения в трансдукцию апоптогенного сигнала p38 MAPK, при этом данный эффект не является дозозависимым.

### 3.1.3. Особенности изменения митохондриального трансмембранного потенциала при модуляции внутриклеточной концентрации оксида азота и в условиях выключения p38 MAPK-зависимых механизмов

Известно, что инициация программированной клеточной гибели может происходить по различным сценариям (с вовлечением

митохондриального и рецепторного путей). Для выяснения состояния митохондриального пути запуска апоптоза при увеличении внутриклеточной концентрации оксида азота нами была проведена оценка количества клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом.

В культуре лейкемических Т-лимфобластов с использованием метода лазерной проточной цитофлуориметрии нами было зарегистрировано достоверное снижение указанного параметра до 1,10(0,70-1,20)% по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров [5,60(5,30-6,90)%], ( $p < 0,05$ ). Воздействие SNP в дозе 100 мМ на культуру интактных клеток линии Jurkat и клеток линии Jurkat с ингибированной p38 киназой вызывало достоверное повышение количества клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом до 74,50(67,10-79,20)% и 75,90(70,80-76,20)%, соответственно, по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). При этом различий между значениями в указанных экспериментальных моделях не отмечалось ( $p > 0,05$ ). К достоверному увеличению указанного параметра [до 80,70(76,20-84,30)%] приводило и добавление к интактной культуре Jurkat NOC-5 в дозе 100 мкМ. Совместное инкубирование клеток линии Jurkat с селективным ингибитором p38 MAPK и NOC-5 в дозе 100 мкМ также приводило к достоверному увеличению количества клеток со сниженным  $\Delta\psi$  [до 89,90(88,00-92,30)%] как по сравнению с интактной культурой, так и по сравнению с культурой клеток, инкубированной с NOC-5 в концентрации 100 мкМ ( $p < 0,05$ ) (рис. 10).

Таким образом, исходя из полученных фактических данных, нами было высказано предположение, что повышение внутриклеточной концентрации оксида азота приводит к снижению трансмембранного митохондриального потенциала как при воздействии SNP в дозе 100 мМ, так и при действии NOC-5 в концентрации 100 мкМ.

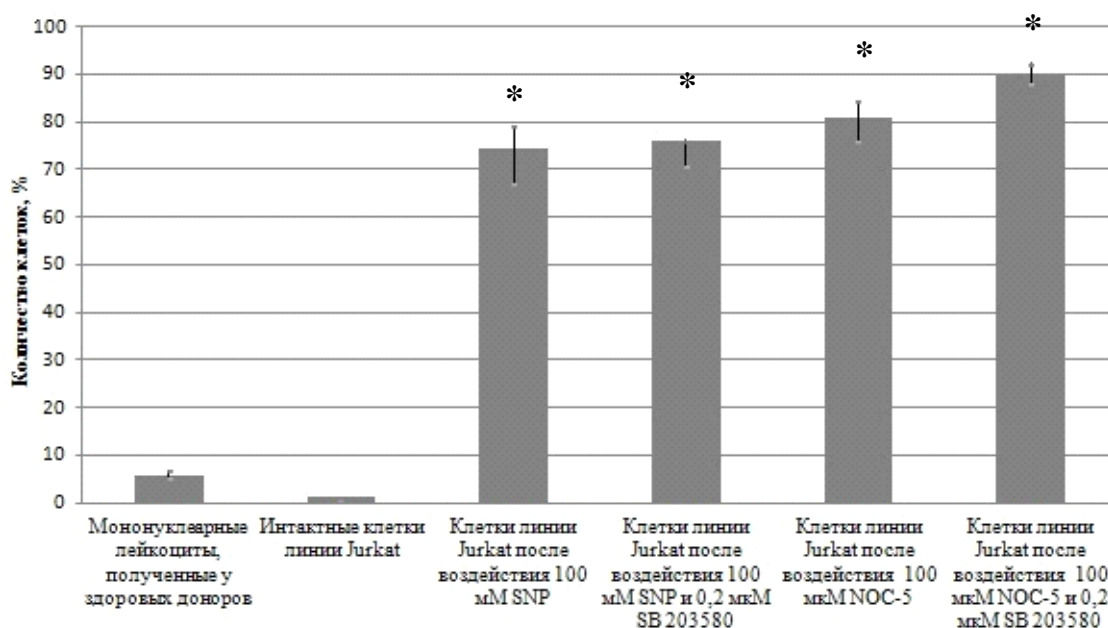


Рис. 10. Количество клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом в условиях повышения внутриклеточной концентрации оксида азота, Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>), \*-достоверность различий по сравнению с интактными клетками линии Jurkat

Кроме того, падение трансмембранного митохондриального потенциала в ответ на действие донора оксида азота (SNP) не зависит от p38 MAP киназы, действие NOC-5 частично опосредовано активностью указанной киназой.

### 3.1.4. Особенности изменения содержания белков семейства Bcl-2 при изменении внутриклеточной концентрации оксида азота и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов

Снижение трансмембранного митохондриального потенциала может быть вызвано повышением проницаемости наружной митохондриальной мембраны вследствие образования в ней селективных либо неселективных пор (специфических или неспецифических). Ключевыми специфическими белками-регуляторами митохондриального пути апоптоза являются белки семейства Bcl-2.

В результате проведенного в нашей лаборатории исследования содержания антиапоптотического белка Bcl-2 в интактной культуре Т-лимфоцитарной лейкемии методом вестерн-блоттинга было установлено, что его значения оказались достоверно увеличены по сравнению с таковыми в

мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров [2,17(1,87-2,48) и 0,59(0,48-0,67) усл.ед., соответственно,  $p < 0,05$ ]. Анализ содержания Vcl-2 в клетках линии Jurkat, инкубированных в течение 15 мин с 100 мМ SNP, показал достоверно значимое увеличение значений данного параметра до 17,65(12,72-21,5) усл.ед., по сравнению с интактной культурой ( $p < 0,05$ ) (рис. 11). Предварительное ингибирование p38 MAP-киназы ослабляло эффект от воздействия донора оксида азота на содержание протеина Vcl-2 в клетках линии Jurkat [8,86(7,95-9,76) усл.ед.,  $p < 0,05$ ], по сравнению с изолированным действием NO, однако не приводило к снижению этой величины до контрольных значений ( $p < 0,05$ ).

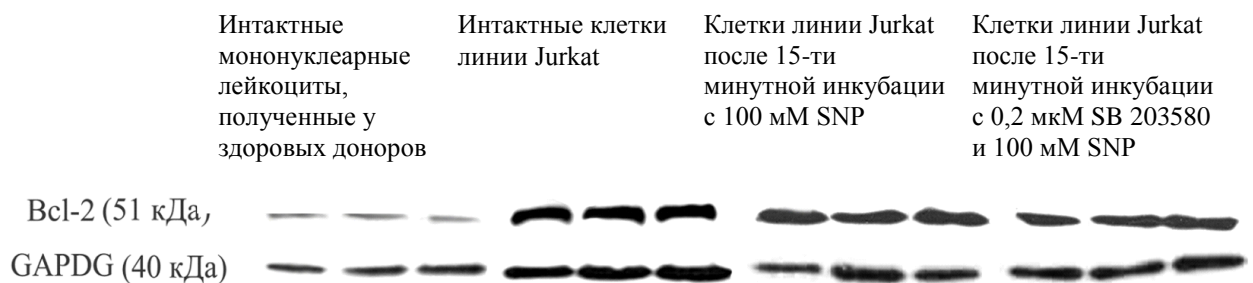


Рис. 11. Внутриклеточное содержание белка Vcl-2 в условиях воздействия донора оксида азота

24-х часовая инкубация клеток линии Jurkat NOC-5 в дозе 100 мкМ приводила к достоверному повышению содержания белка Vcl-2 до 3,67(3,35-3,73) усл.ед., по сравнению с интактной культурой ( $p < 0,05$ ) (рис. 12).

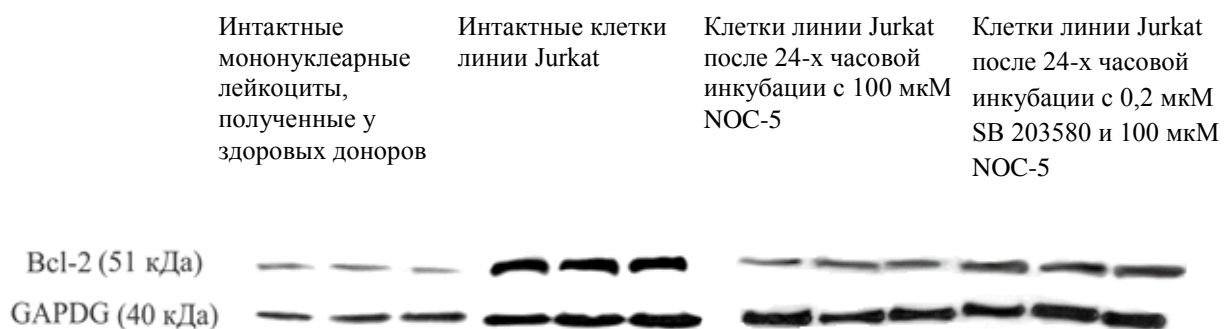


Рис. 12. Внутриклеточное содержание белка Vcl-2 в условиях воздействия донора оксида азота

Ингибирование p38 MAPK и воздействие 100 мкМ NOC-5 на интактные клетки линии Jurkat также достоверно повышало содержание

исследуемого протеина до 5,20(4,86-5,57) усл.ед., по сравнению с изолированным действием газа ( $p<0,05$ ) (рис. 12).

Стоит отметить, что инкубация с SNP приводила к достоверно более выраженному повышению содержания белка Bcl-2 по сравнению с воздействием NOC-5; при этом эффект SNP был p38 MAPK-опосредованным, в то время, как воздействие NOC-5 на фоне блокированной активности p38 MAP киназы вызывало еще более выраженное повышение содержания исследуемого белка.

При оценке содержания другого антиапоптотического белка Bcl-X<sub>L</sub> в мононуклеарных лейкоцитах крови у здоровых доноров и в клетках линии Jurkat (рис. 12) статистически значимых различий между сравниваемыми группами выявлено не было [10,34(8,28-10,53) и 10,21(7,72-12,70) усл.ед., соответственно,  $p>0,05$ ]. При инкубировании клеток линии Jurkat с донором оксида азота в концентрации 100 мМ содержание изучаемого белка достоверно не изменялось [12,35(10,34-14,6) усл.ед.] относительно его количества в интактных клетках ( $p>0,05$ ). При предварительной обработке селективным ингибитором p38 MAPK клеток линии Jurkat и дальнейшем воздействии нитропрусида натрия в проапоптотической дозе содержание Bcl-xL достоверно увеличивалось относительно контроля и составляло 16,09 (16,04-16,14) усл. ед. ( $p<0,05$ ), превышая при этом и величину показателя при изолированном действии SNP ( $p<0,05$ ) (рис. 13).

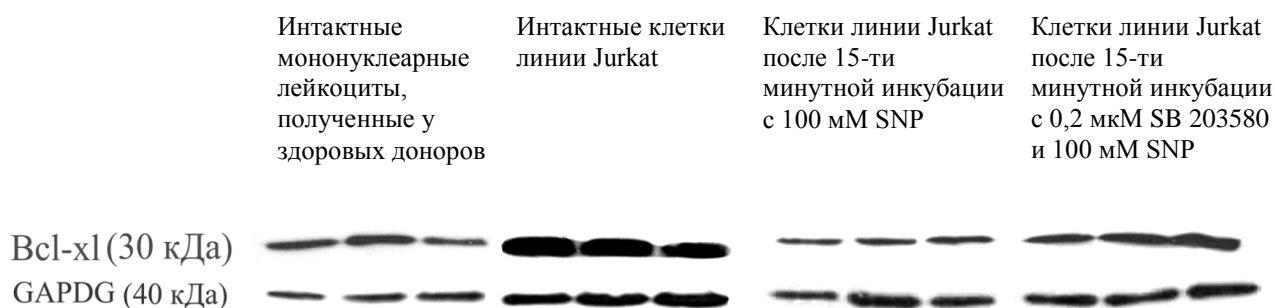


Рис. 13. Внутриклеточное содержание белка Bcl-xL в условиях воздействия донора оксида азота

Оценка содержания белка Vcl-xL в клетках линии Jurkat после воздействия NOC-5 в дозе 100 мкМ, и в клетках, где была предварительно ингибирована p38 MAP киназа, показала, что уровень исследуемого белка составлял 10,98(9,86-11,71) и 12,90(12,11-13,67) усл.ед., соответственно, ( $p>0,05$ ). Указанные значения также не отличались от содержания белка Vcl-xL в интактных клетках ( $p>0,05$ ) (рис. 14).

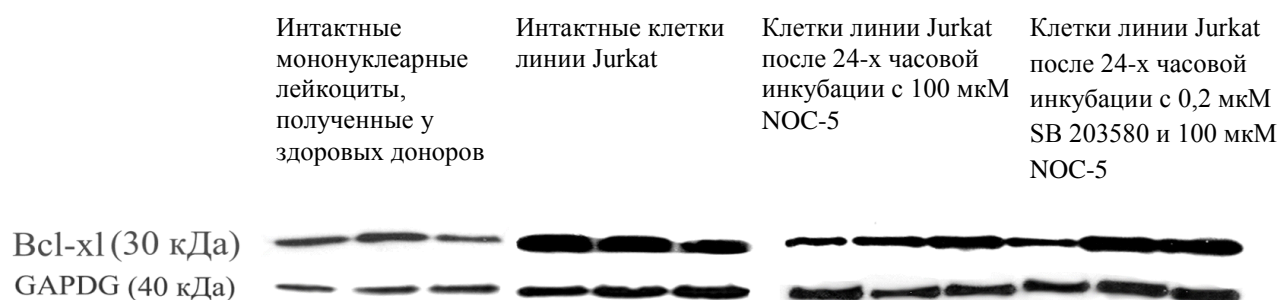


Рис. 14. Внутриклеточное содержание белка Vcl-xL в условиях воздействия донора оксида азота

Следовательно, по итогам проведенного исследования было установлено, что повышение внутриклеточной концентрации оксида азота не приводит к изменению содержания белка Vcl-xL; в случае с воздействием SNP данный эффект отменяется при блокировании p38 MAPK и содержание указанного протеина повышается.

Анализ содержания протеина Vad в клетках линии Jurkat и в моноклеарных лейкоцитах, полученных из крови у здоровых доноров, не выявил статистически значимых различий в соответствующих группах [1,25(1,11-1,38) и 0,83(0,66-0,92) усл.ед., соответственно,  $p>0,05$ ].

Инкубирование клеток линии Jurkat с SNP в концентрации 100 мМ не приводило к достоверному изменению содержания белка Vad [1,14(0,47-1,71) усл.ед.] относительно интактных клеток ( $p>0,05$ ). Ингибирование p38 MAP киназы совместно с добавлением в культуру Т-лимфобластного лейкоза SNP в дозе 100 мМ достоверно увеличивало содержание исследуемого протеина до 8,18(7,48-8,89) усл.ед., по сравнению с интактной культурой ( $p<0,05$ ) и после изолированного действия SNP ( $p<0,05$ ) (рис. 15).



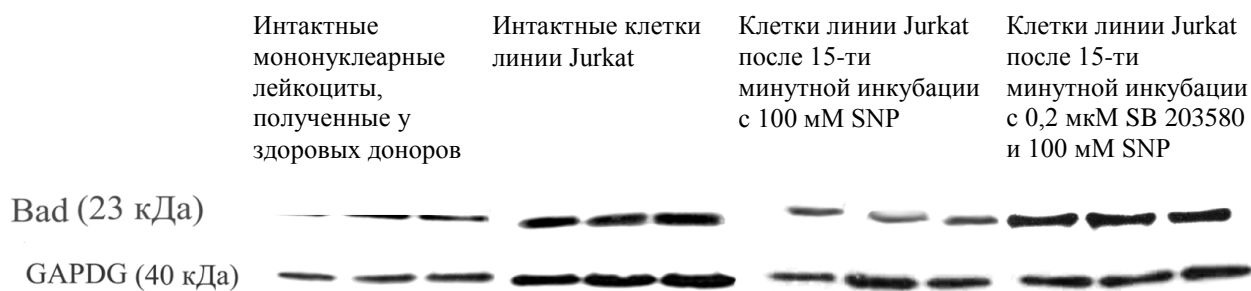


Рис. 15. Внутриклеточное содержание белка Bad в условиях воздействия донора оксида азота

Воздействие NOC-5 в дозе 100 мкМ на интактные и предварительно обработанные селективным ингибитором p38 MAPK клетки линии Jurkat приводило к достоверному повышению содержания белка bad до 3,00(2,91-3,33) и 3,83(3,82-4,13) усл.ед., соответственно, относительно уровня указанного белка в интактных клетках ( $p < 0,05$ ). Достоверных различий между клетками с активной и ингибированной p38 MAPK найдено не было ( $p > 0,05$ ) (рис. 16).

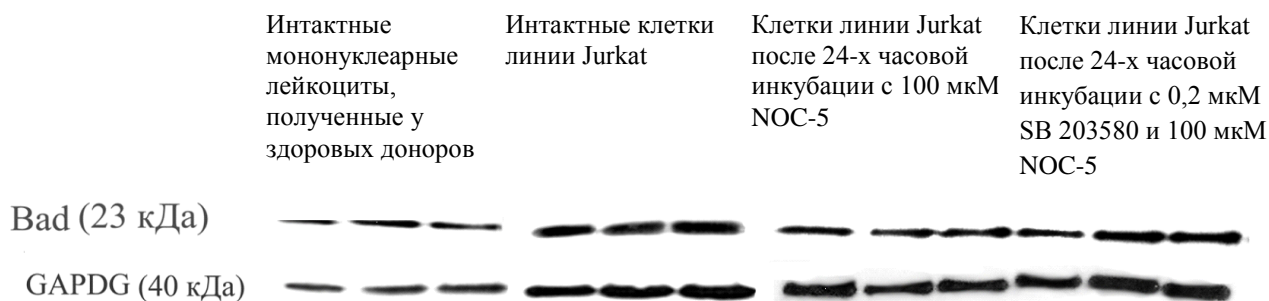


Рис. 16. Внутриклеточное содержание белка Bad в условиях воздействия донора оксида азота

Полученные данные свидетельствуют о том, что донор оксида азота NOC-5 в p38-независимой манере приводит к повышению содержания белка Bad. Изменения внутриклеточной концентрации оксида азота с помощью другого донора оксида азота SNP не влияют на содержание белка Bad, однако, аналогичное воздействие на фоне блокированной p38 MAPK приводит к повышению содержания изучаемого белка.

Таким образом, различная степень изменения внутриклеточной концентрации оксида азота по-разному влияет на содержание ключевых

белков семейства Bcl-2. Изменения содержания белков данного семейства при действии миллимолярной дозы оксида азота являются p38 MAPK-зависимыми. При действии на клетки микромолярной дозы оксида азота p38 MAP киназа вовлечена только в регуляцию содержания протеина Bcl-2.

### **3.1.5 Особенности экспрессии генов белков-регуляторов апоптоза при изменении внутриклеточной концентрации оксида азота и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов**

Для проверки гипотезы о том, что зафиксированные нами изменения содержания белков семейства Bcl-2 при воздействии доноров газовых транмиттеров *in vitro* являются результатом изменения транскрипции соответствующих генов, нами была проведена оценка уровня мРНК генов bcl-2, bcl-xl, bad, а также гена bax. При исследовании содержания мРНК гена bcl-2 было показано, что величина данного показателя в мононуклеарных лейкоцитах у здоровых доноров соответствовала 2,36(2,15–2,41) усл. ед. Величина указанного параметра в клетках линии Jurkat оказалась в 2 раза ниже таковой - [5,84(5,35-6,12) усл.ед.] ( $p < 0,05$ ). При инкубации Т-лимфобластных лейкоцитов с SNP в дозе 100 мМ отмечалось снижение уровня экспрессии мРНК [до 3,78(3,76-3,8) усл.ед.] относительно соответствующего значения в интактной культуре опухолевых клеток ( $p < 0,05$ ). Экспрессия гена bcl-2 после предварительного ингибирования p38 MAPK и воздействия SNP в дозе 100 мМ составляла 4,89(4,35-5,51) усл.ед. и достоверно не отличалась от такового в интактных клетках ( $p > 0,05$ ), статистически значимо превышая таковое после инкубирования клеток только со 100 мМ SNP ( $p < 0,05$ ). Уровень мРНК гена bcl-2 при воздействии 100 мкМ NOC-5 на интактные клетки и клетки линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK достоверно снижался, по сравнению с интактной клеточной культурой, и составлял 0,79(0,72-0,98) и 0,89(0,49-1,08) усл.ед., соответственно, ( $p < 0,05$ ). При этом различия между группами с активной и ингибированной p38 MAP киназой отсутствовали ( $p > 0,05$ ) (табл. 10).

Таблица 10

Особенности экспрессии генов семейства *bcl-2* при инкубации в условиях повышения внутриклеточной концентрации оксида азота,  $Me(Q_1-Q_3)$ ,  $n=4$

Условия инкубации	Экспрессия гена <i>bcl-2</i> , усл.ед.	Экспрессия гена <i>bcl-xl</i> , усл.ед.	Экспрессия гена <i>bad</i> , усл.ед.	Экспрессия гена <i>baх</i> , усл.ед.
Мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров	2,36 (2,15-2,41)	1,40 (1,21-3,65)	1,3 (0,89-1,92)	0,42 (0,37-0,49)
Интактные клетки линии Jurkat	5,84 (5,35-6,12) $p_1 < 0,05$	9,92 (9,76-13,33) $p_1 < 0,05$	3,1 (2,47-3,19) $p_1 < 0,05$	0,91 (0,85-1,35) $p_1 < 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 100 мМ SNP	3,78 (3,76-3,8) $p_2 < 0,05$	1,83 (1,74-1,92) $p_2 > 0,05$	3,2 (3,0-3,4) $p_2 < 0,05$	3,03 (2,16-3,89) $p_2 < 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 100 мМ SNP и 0,2 мкМ SB 203580	4,89 (4,35-5,51) $p_2 > 0,05$	2,73 (2,46-3,28) $p_2 > 0,05$	2,06 (2,0-2,09) $p_2 > 0,05$	0,73 (0,64-0,81) $p_2 > 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 100 мкМ NOC-5	0,79 (0,72-0,98) $p_2 < 0,05$	1,13 (0,98-1,26) $p_2 > 0,05$	39,80 (20,37-49,19) $p_2 < 0,05$	2,76 (2,37-3,29) $p_2 < 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 100 мкМ NOC-5 и 0,2 мкМ SB 203580	0,89 (0,49-1,08) $p_2 < 0,05$	1,86 (1,14-1,96) $p_2 > 0,05$	37,39 (31,86-43,12) $p_2 < 0,05$	2,08 (1,79-2,35) $p_2 < 0,05$

Примечание (здесь и в табл. 10 и 12):  $p_1$  - достоверность различий по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров;  $p_2$  - достоверность различий по сравнению с интактной культурой линии Jurkat

Воздействие микромолярной концентрации оксида азота приводило к более интенсивному снижению экспрессии гена *bcl-2*, не являвшемся при этом  $p38$ -опосредованным. Донор оксида азота в миллимолярной дозе также отличался свойствами негативного регулятора экспрессии гена *bcl-2*, действующего через  $p38$  MAPK. По всей видимости, действие оксида азота в различных дозах затрагивает различные молекулярные мишени и механизмы регуляции экспрессии гена *bcl-2*.

Изучение экспрессии мРНК гена *bcl-X<sub>L</sub>* в мононуклеарных лейкоцитах крови у здоровых доноров методом PCR-RT показало, что значения данного параметра соответствовали 1,40(1,21–3,65) усл.ед., в интактных клетках линии Jurkat - 9,92 (9,76-13,33) усл.ед. ( $p < 0,05$ ). Воздействие SNP в концентрации 100 мМ на интактные клетки линии Jurkat

и клетки с ингибированной p38 киназой сопровождалось снижением экспрессии мРНК гена *bcl-X<sub>L</sub>* [1,83(1,74–1,92) и 2,73(2,46–3,28) усл.ед., соответственно], по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Однако значения, зарегистрированные в культуре, инкубированной только с донором оксида азота, оказались достоверно ниже соответствующих параметров, полученных при культивировании клеток линии Jurkat с донором оксида азота на фоне блокированной p38 MAPK ( $p < 0,05$ ). Значения экспрессии гена *bcl-xl* при воздействии NОС-5 в дозе 100 мкМ на интактные клетки и клетки линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK достоверно снижались, по сравнению с соответствующими показателями в интактной культуре, и составляли 1,13(0,98–1,26) и 1,86(1,14–1,96) усл.ед., соответственно ( $p < 0,05$ ). При этом различия между группами с активной и ингибированной p38 MAP киназой отсутствовали ( $p > 0,05$ ) (табл. 10). Использование оксида азота в обоих исследованных дозах подавлял экспрессию гена *bcl-xl* независимо от активности p38 киназы.

Исследования уровня мРНК гена *baх* продемонстрировали, что экспрессия данного гена в мононуклеарных лейкоцитах у здоровых доноров составляла 0,42(0,37–0,49) усл.ед., что оказалось в 2 раза ниже соответствующего параметра в клетках линии Jurkat [0,91(0,85–1,35) усл.ед.] ( $p < 0,05$ ). Добавление в культуральную среду бласттрансформированных клеток 100 мМ SNP приводило к достоверному увеличению уровня мРНК до 3,03(2,16–3,89) усл.ед. относительно интактной культуры ( $p < 0,05$ ). При воздействии 100 мМ SNP на культуру, предварительно обработанную селективным ингибитором p38 MAPK, достоверных различий в уровне мРНК гена *baх*, по сравнению с интактной культурой, выявлено не было [0,73(0,64–0,81) усл.ед.,  $p > 0,05$ ]. По сравнению с изолированным действием газа, значения указанного параметра снижались ( $p < 0,05$ ). Добавление NОС-5 в дозе 100 мкМ к интактным клеткам линии Jurkat и клеткам линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK приводило к достоверному повышению содержания мРНК изучаемого гена до 2,76(2,37–3,29) и 2,08(1,79–2,35)

усл.ед., соответственно, по сравнению с интактной культурой ( $p < 0,05$ ); при этом между группами сравнения достоверных различий выявлено не было ( $p > 0,05$ ) (табл. 10). Вероятно, SNP-опосредованная сверхэкспрессия гена *bx* сопровождается активацией p38 MAP киназы, в то время как NOC-5-опосредованная – является p38-независимой.

Оценка уровня экспрессии мРНК гена *bad* показала, что его величина в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, составляла 1,30(0,89-1,92) усл.ед.; в интактной культуре Т-лимфобластного лейкоза значения аналогичного параметра оказались достоверно выше и соответствовали 3,10(2,47-3,19) усл.ед. ( $p < 0,05$ ). Воздействие SNP в концентрации 100 мМ на клетки линии Jurkat *in vitro* не приводило к изменениям экспрессии мРНК данного гена [3,20(3,00-3,40) усл.ед.] относительно контрольных значений ( $p > 0,05$ ) (табл. 10). Воздействие донора оксида азота в указанной концентрации на культуру клеток линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK приводило к достоверному снижению уровня мРНК гена *bad* (2,06(2,00-2,09) усл.ед.) как по сравнению с интактной культурой ( $p < 0,05$ ), так и по сравнению с изолированным действием газа ( $p < 0,05$ ). Добавление к интактной культуре линии Jurkat NOC-5 в концентрации 100 мкМ вызывало достоверное увеличение содержания мРНК гена *bad* [39,80(20,37-49,19) усл.ед.] по сравнению с интактной культурой ( $p < 0,05$ ). Ингибирование p38 киназы не приводило к достоверным изменениям изучаемого параметра в культуре клеток, подвергшихся воздействию NOC-5 [37,39(31,86-43,12) усл.ед.,  $p > 0,05$ ]. При этом экспрессия гена *bad* при воздействии на клетки SB203580 и NOC-5 оказалась достоверно выше таковой в интактных клетках ( $p < 0,05$ ). Из представленных данных видно, что микромолярная доза донора оксида азота приводит к гиперэкспрессии гена *bad* независимо от состояния p38 MAP киназы. При этом повышение экспрессии гена *bad* в интактных клетках линии Jurkat является, отчасти, p38-зависимым.

Таким образом, увеличение внутриклеточной концентрации доноров оксида азота в клетках линии Jurkat приводит к дисбалансу экспрессии генов белков семейства Bcl-2; указанный процесс сопровождался активацией p38 MAPK.

### **3.1.6. Особенности экспрессии генов и содержания соответствующих белков-ингибиторов каспаз при изменении внутриклеточной концентрации оксида азота и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов**

Регуляция апоптотической гибели клетки осуществляется не только посредством баланса белков семейства bcl-2; еще одним из этапов контроля апоптоза является деятельность белков-ингибиторов каспаз. Последние могут являться мишенями действия внутриклеточных газовых трансммиттеров. Для проверки данной гипотезы нами было определено содержание белков и соответствующих транскриптов генов *xIAP* и *aven*.

Методом вестерн-блоттинга была осуществлена оценка содержания *xIAP* в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров и в клетках линии Jurkat. Содержание указанного протеина в мононуклеарных лейкоцитах составило 8,97(7,2-11,3) усл.ед. В клетках линии Jurkat содержание *xIAP* оказалось более значимым [15,57 (14,29-16,84) усл. ед.,  $p < 0,05$ ]. Добавление SNP в концентрации 100 мМ к клеткам Т-лимфобластной лейкемии приводило к достоверному увеличению количества изучаемого протеина до 21,47(20,31-28,44) усл.ед., по сравнению с интактной культурой ( $p < 0,05$ ). Предшествующая этому инкубация с селективным ингибитором p38 MAPK в дозе 0,2 мкМ вызывала достоверное снижение данного параметра [до 8,09(6,98-9,2) усл. ед.] относительно такового после изолированного действия донора оксида азота и в интактных клетках ( $p < 0,05$ ) (рис. 17).

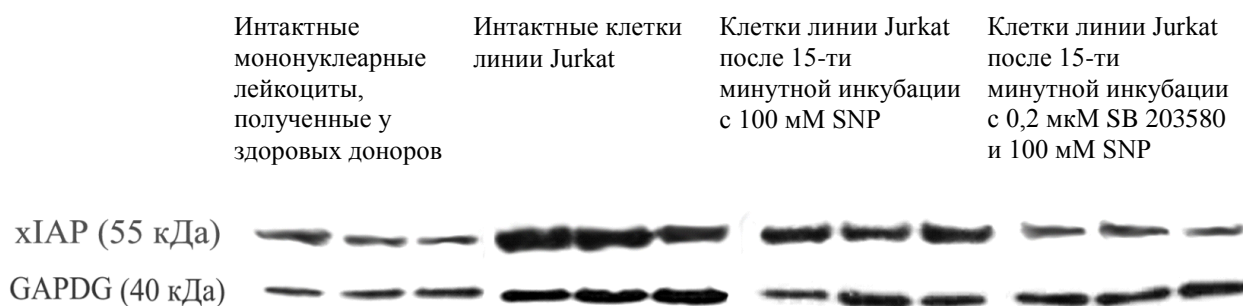


Рис. 17. Внутриклеточное содержание белка xIAP в условиях воздействия донора оксида азота

Инкубирование клеток линии Jurkat с NOC-5 в дозе 100 мкМ приводило к статистически значимому повышению содержания белка xIAP [до 21,68(20,63-22,05) усл.ед.] по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Предварительное добавление в культуральную среду химического ингибитора p38 MAP киназы и последующее воздействие 100 мкМ NOC-5 вызывало достоверное снижение содержания протеина до 11,02(9,56-11,90) усл.ед. по сравнению с воздействием NOC-5 на интактную культуру ( $p < 0,05$ ) (рис. 18). Данные результаты позволяют предположить вовлеченность p38 киназы в NOC-5-опосредованное повышение содержания белка xIAP.

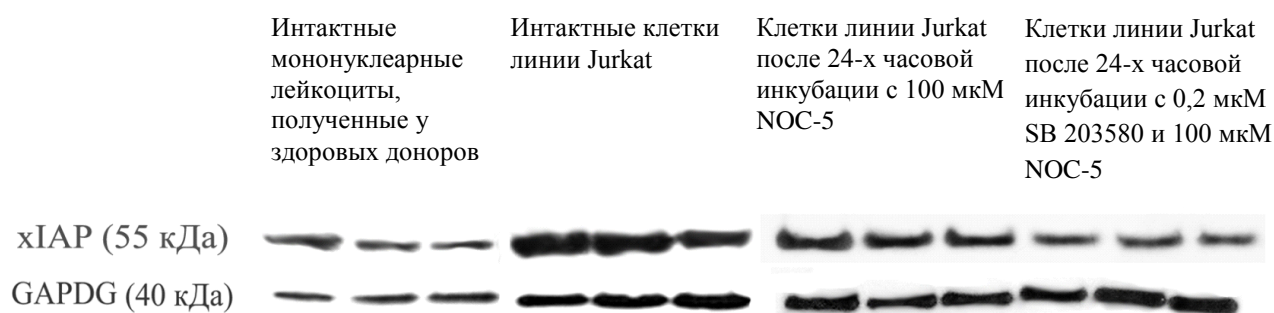


Рис. 18. Внутриклеточное содержание белка xIAP в условиях воздействия донора оксида азота

Оценка уровня белка-ингибитора каспаз Aven показала, что в клетках линии Jurkat содержание данного протеина составило 1,51(1,43-1,59) усл.ед. В мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, значения указанного параметра были достоверно снижены и соответствовали 0,04(0,02-0,08) усл.ед. ( $p < 0,05$ ). Анализ содержания Aven в клетках линии

Jurkat при воздействии 100 мМ SNP не продемонстрировал достоверного изменения данного показателя по сравнению с интактной культурой [1,41(0,87-2,12) усл.ед.,  $p>0,05$ ] (рис. 19).

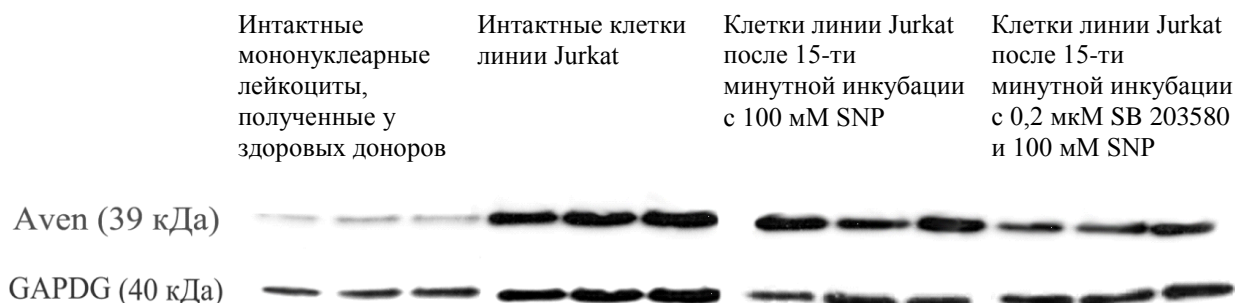


Рис. 19. Внутриклеточное содержание белка Aven в условиях воздействия донора оксида азота

Предварительное выключение р38 MAPK пути также не приводило к достоверному изменению содержания Aven по сравнению с интактной культурой [1,75(1,27-2,23) усл.ед.,  $p>0,05$ ] (рис. 19) и клетками, инкубированными со 100 мМ SNP ( $p>0,05$ ).

Инкубация клеток линии Jurkat с NOC-5 в проапоптотической дозе, равной 100 мкМ, вызывала достоверное повышение содержания белка Aven до 3,87(3,71-4,38) усл.ед. по сравнению с аналогичными значениями в интактной культуре ( $p<0,05$ ).

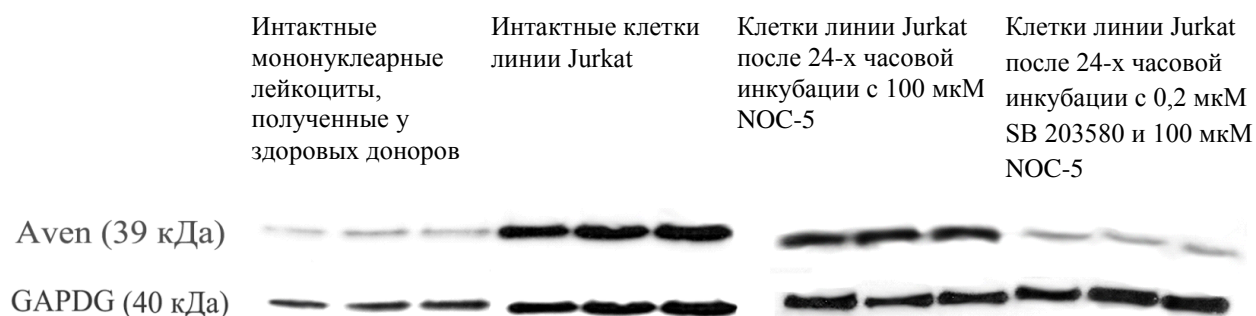


Рис. 20. Внутриклеточное содержание белка Aven в условиях воздействия донором оксида азота

Воздействие на клетки линии Jurkat NOC-5 в дозе 100 мкМ на фоне ингибированной р38 киназы приводило к достоверному снижению



содержания анализируемого белка до 0,25(0,25-0,25) усл.ед., по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) и изолированным действием газа ( $p < 0,05$ ) (рис. 20). Результаты, полученные при изучении экспрессии генов  $\chi IAP$  и  $Aven$ , представлены в таблице 11.

Таблица 11

Экспрессия генов  $Aven$  и  $\chi IAP$  (усл. ед.) при инкубации в условиях повышения внутриклеточной концентрации доноров оксида азота, ( $Me(Q_1-Q_3)$ )

Условия инкубации	Экспрессия гена $Aven$ , усл.ед.	Экспрессия гена $\chi IAP$ , усл.ед.
Мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров	5,17 (5,02-5,36)	6,07 (4,87-7,98)
Интактные клетки линии Jurkat	1,99 (1,63-2,0) $p_1 < 0,05$	4,97 (4,88-5,4) $p_1 > 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 100 мМ SNP	0,31 (0,3-0,32) $p_2 < 0,05$	0,24 (0,21-0,27) $p_2 < 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 100 мМ SNP и 0,2 мкМ SB 203580	0,45 (0,37-0,46) $p_2 < 0,05$	0,92 (0,73-1,35) $p_2 < 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 100 мкМ NOC-5	2,28 (1,68-2,86) $p_2 > 0,05$	0,28 (0,23-0,38) $p_2 < 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 100 мкМ NOC-5 и 0,2 мкМ SB 203580	1,22 (0,74-1,71) $p_2 > 0,05$	0,55 (0,38-0,46) $p_2 < 0,05$

Нами было показано, что в опухолевых клетках линии Jurkat количество мРНК гена  $\chi IAP$  достоверно не отличается от уровня мРНК исследуемого гена в мононуклеарных лейкоцитах [4,97(4,88-5,4) и 6,07(4,87-7,98) усл.ед. соответственно,  $p > 0,05$ ]. Инкубирование клеток линии Jurkat с SNP в дозе 100 мМ значимо снижало уровень мРНК гена  $\chi IAP$  до 0,24(0,21-0,27) усл.ед. по сравнению с интактной культурой клеток линии Jurkat ( $p < 0,05$ ). Предварительное инкубирование клеток линии Jurkat с селективным ингибитором p38 MAP киназы повышало экспрессию гена  $\chi IAP$  до 0,92(0,73-1,35) усл.ед, по сравнению с аналогичным параметром, измеренным в культуре клеток, обработанных только донором окиси азота ( $p < 0,05$ ). Культивирование интактных клеток линии Jurkat и клеток с

предварительно ингибированной p38 MAP киназой с NOC-5 в дозе 100 мкМ приводило к достоверному снижению уровня мРНК гена *xIAP*, по сравнению с интактной культурой [до 0,28(0,23-0,38) и 0,55(0,38-0,46) усл. ед., соответственно,  $p < 0,05$ ]. При этом различия между группами с активной и ингибированной p38 MAP киназой отсутствовали ( $p > 0,05$ ) (табл. 11). Содержание мРНК гена *Aven* оказалось достоверно снижено в клетках линии Jurkat, по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами [1,99(1,63-2,0) усл.ед. и 5,17(5,02-5,36) усл.ед., соответственно] ( $p < 0,05$ ). При инкубировании клеток линии Jurkat с SNP в концентрации 100 мМ экспрессия гена *Aven* значимо снижалась относительно аналогичных значений в интактных клетках линии Jurkat в 10 раз и составляла 0,31(0,3-0,32) усл.ед. ( $p < 0,05$ ). Выключение p38-зависимых сигнальных путей в клетках линии Jurkat с помощью селективного ингибитора не приводило к статистически значимому изменению уровня мРНК гена *Aven* [0,45(0,37-0,46) усл.ед.] по сравнению с аналогичными значениями в клетках линии Jurkat после добавления в культуральную среду донора оксида азота ( $p > 0,05$ ). Добавление NOC-5 в дозе 100 мкМ к интактным клеткам линии Jurkat и к клеткам с предварительно ингибированной p38 MAP киназой не приводило к достоверным изменениям исследуемого параметра по сравнению с интактной культурой клеток линии Jurkat [2,28(1,68-2,86) усл.ед. и 1,22(0,74-1,71) усл.ед., соответственно,  $p > 0,05$ ]. При этом различия между группами с активной и ингибированной p38 MAP киназой отсутствовали ( $p > 0,05$ ) (табл. 11).

Следует отметить, что различное повышение внутриклеточной концентрации оксида азота *in vitro* по-разному сказывается на экспрессии гена *aven* (микромольная концентрация не изменяет экспрессию гена, в то время как миллимольная - снижает) и схоже влияет на экспрессию гена *xIAP* (обе дозы подавляют экспрессию); при этом только экспрессия гена *xIAP* при воздействии проапоптотической дозы SNP является p38-зависимой.

Таким образом, воздействие *in vitro* доноров оксида азота в микро- и миллимольной дозах на клетки линии Jurkat приводит к p38 MAP-

опосредованному дисбалансу экспрессии генов и содержания соответствующих белков-ингибиторов каспаз.

### 3.1.7. Особенности активности каспазы-3 и -9 при изменении внутриклеточной концентрации оксида азота и выключении р38 MAPK-зависимых механизмов

Поскольку ключевыми эффекторными молекулами реализации апоптоза является семейство каспаз, нами была определена активность каспаз-3 и -9. Полученные результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12

Активность каспаз-3 и -9 (усл. ед.) в клетках линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах в условиях воздействия донора оксида азота, (Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Условия инкубации	Активность каспазы-3, усл.ед.	Активность каспазы-9, усл.ед.
Интактные клетки линии Jurkat	1,00 (0,99-1,01)	1,00 (0,99-1,01)
Мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров	0,72 (0,71-0,73) p<0,05	1,40 (1,30-1,50) p<0,05
Клетки линии Jurkat после воздействия 100 мМ SNP	2,17 (2,04-2,19) p<0,05	3,09 (3,06-3,11) p<0,05
Клетки линии Jurkat после воздействия 100 мМ SNP и 0,2 мкМ SB 203580	0,37 (0,31-0,42) p<0,05	0,92 (0,88-0,95) p>0,05
Клетки линии Jurkat после воздействия 100 мкМ NOC-5	1,62 (1,57-1,66) p<0,05	0,96 (0,91-1,01) p>0,05
Клетки линии Jurkat после воздействия 100 мкМ NOC-5 и 0,2 мкМ SB 203580	0,80 (0,76-0,84) p<0,05	0,38 (0,36-0,40) p<0,05

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с интактной культурой линии Jurkat

Культивирование клеток линии Jurkat с SNP в дозе 100 мМ вызывает достоверное повышение активности каспазы-3 и -9, по сравнению с интактной культурой [2,17 (2,04-2,19) и 3,09 (3,06-3,11) усл.ед., соответственно, против 1,00(0,99-1,01) и 1,00(0,99-1,01) усл.ед., p<0,05]. При этом аналогичные условия культивирования на фоне ингибированной р38 MAPK приводили к снижению активности анализируемых каспаз [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 ( $p < 0,05$ ). Стоит отметить, что активность каспазы-3 оказалась достоверно ниже соответствующих значений в интактной культуре ( $p < 0,05$ ). Воздействие NOC-5 в дозе 100 мкМ приводило к достоверному повышению активности только каспазы-3 [1,62 (1,57-1,66) усл.ед.,  $p < 0,05$ ], в то время как активность каспазы-9 от контрольных значений достоверно не отличалась [0,96 (0,91-1,01) усл.ед.,  $p > 0,05$ ]. Однако на фоне блокирования p38 MAPK воздействие NOC-5 оказывало ингибирующее действие на активность каспазы-9, снижая ее до 0,38 (0,36-0,40) усл.ед. по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Активность каспазы-3 при этом достоверно не отличалась от контрольных значений [0,80 (0,76-0,84) усл.ед.,  $p > 0,05$ ] (табл. 12).

Таким образом, воздействие донора оксида азота в миллимолярной дозе в большей степени оказывает индуцирующий эффект на активность каспазы-3 по сравнению с воздействием его в микромолярной дозе ( $p < 0,05$ ). Оба донора, вероятно, опосредуют свое влияние через p38 MAPK. На активность каспазы-9 оказывало влияние только воздействие SNP в дозе 100 мМ, также вовлекая p38 MAPK. Культивирование клеточных культур с NOC-5 изменяло активность каспазы-9 в условиях блокирования p38 киназы.

### **3.1.8. Оценка количества клеток, экспрессирующих TNFR1, и уровня TNF $\alpha$ в супернатантах культур клеток при изменении внутриклеточной концентрации оксида азота и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов**

Известно, что инициация апоптоза происходит не только вследствие изменения состояния митохондрий, но и рецептор-опосредованно. Оценка числа клеток, презентующих на своей поверхности TNF-R1, в интактной культуре мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, выявила, что 2,01 (0,91–3,04)% клеток несут данный мембраносвязанный рецептор (табл. 13).

Анализ способности клеток презентировать на плазматической мембране TNF-R1 не выявил достоверных различий процентного содержания TNFR1-положительных клеток [2,00(1,35-2,45)%] в культуре Т-лимфобластной лейкемии, по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров ( $p>0,05$ ). Численность TNFR1-экспрессирующих клеток линии Jurkat после инкубации со 100 мМ SNP оказалась выше [17,93(14,30-24,20)%,  $p<0,05$ ] таковой в интактной культуре клеток линии Jurkat, при этом достоверно не отличалась от таковой в культуре с предварительно ингибированной p38 MAPK [25,00(20,55-28,55)%,  $p>0,05$ ].

Инкубирование интактных клеток линии Jurkat и клеток линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK с NOC-5 в дозе 100 мкМ не вызывало достоверных изменений изучаемого параметра [1,53(1,35-1,75) и 3,90(3,85-4,00)% соответственно], по сравнению с контролем ( $p>0,05$ ). При этом изолированное действие донора оксида азота приводило к снижению числа рецептор-положительных клеток по сравнению с аналогичными значениями, полученными при оценке культуры клеток, где была предварительно ингибирована p38 MAPK ( $p<0,05$ ) (табл. 13). Однако, наличие на поверхности клеток рецепторов не является достаточным для инициации апоптоза. В связи с этим нами была оценена продукция TNF $\alpha$  мононуклеарными лейкоцитами крови и клетками линии Jurkat. Так, оценка содержания TNF $\alpha$  в супернатантах культуры Т-лимфобластной лейкемии продемонстрировала снижение исследуемого показателя до 11,7 (10,8-12,4) пг/мл относительно мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови у здоровых доноров (885,4 (707,9-995,4) пг/мл) ( $p<0,05$ ). Продукция TNF $\alpha$  клетками линии Jurkat при воздействии на них донора оксида азота существенно снижалась - до 4,2(3,5-4,9) пг/мл по сравнению с интактной культурой ( $p<0,05$ ). Блокирование p38 MAP киназы не влияло на действие на клеточную культуру нитропруссид натрия (6,2 (5,6-6,7) пг/мл) ( $p>0,05$ ). Воздействие на клетки линии Jurkat NOC-5 в концентрации 100 мкМ не

вызывало статистически значимых изменений содержания TNF $\alpha$  в супернатантах ( $p > 0,05$ ). Кроме того, аналогичное воздействие на опухолевые клетки на фоне ингибирования p38 MAP киназы достоверных изменений также не вызывало ( $p > 0,05$ ) (табл. 13).

Таблица 13

Содержание TNF $\alpha$  в супернатантах культур и содержание TNFR1–презентирующих клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов в условиях воздействия доноров оксида азота и селективного ингибитора p38 MAPK, (Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

	Количество TNFR1– положительных клеток, %	Уровень продукции TNF $\alpha$ , 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 мМ SNP и 0,265 мкМ SB 203580	25,00 (20,55-28,55) $p_2 < 0,05$	6,2 (5,6-6,7) $p_2 < 0,05$
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 100 мкМ NOC-5 и 0,265 мкМ SB 203580	3,90 (3,85-4,00) $p_2 < 0,05$	10,9 (10,5-11,2) $p_2 > 0,05$

В целом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что в миллимолярной дозе действие оксида азота повышает готовность опухолевых клеток вступить в рецептор-опосредованный апоптоз, однако, продукция соответствующего лиганда снижается и запуск апоптоза по рецепторному пути остается не реализованным. Действие оксида азота в микромолярной концентрации достоверных изменений в системе лиганд-рецептор не вызывало.

Таким образом, действие оксида азота в высокой (миллимолярной) и низкой (микромолярной) концентрации запускает программированную

гибель клетки, однако опосредуется это явление вовлечением различных молекулярных механизмов. В первом случае мы отмечали повышение содержания преимущественно белка Bcl-2, сопровождавшееся дисбалансом экспрессии генов белков соответствующего семейства, повышение активности каспазы-3 и -9, а также увеличение количества клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом, что, возможно, обусловлено прямым действием на митохондрии оксида азота как активной формы кислорода. Во втором – оксид азота приводил к изменению экспрессии и содержания белков семейства Bcl-2, в частности, повышалось содержание белков Aven, Bcl-2 и Bad. Кроме того, нами было показано, что отдельные молекулярные механизмы действия оксида азота вовлекают в патологический процесс стресс-индуцибельную p38 MAPK.

### **3.2. Особенности реализации запрограммированной гибели клеток линии Jurkat в условиях воздействия донора сульфида водорода *in vitro***

#### **3.2.1. Определение дозы и времени воздействия донора сульфида водорода, необходимых для изменения апоптоза клеток**

В качестве донора сульфида водорода нами был использован гидросульфид натрия (NaHS). На клетки линии Jurkat и мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров, воздействовали указанным веществом в дозах 10, 50, 100 и 500 мкМ, а также 10, 50, 100 и 500 мМ. Инкубация клеток с данными концентрациями NaHS происходила в течение 15 мин и 24 ч. На первом этапе было оценено количество клеток, вступивших в некроз (табл. 14). Статистически значимых различий в количестве клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, вступивших в некроз, после 15-ти минутной инкубации во всех экспериментальных моделях выявлено не было ( $p > 0,05$ ) (табл. 14).

Количество клеток с некротическими признаками в условиях  
повышения внутриклеточной концентрации сульфида водорода,  
(Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)), n=4

Условия инкубации	Число клеток линии Jurkat с некротическими признаками, %		Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими признаками, %	
	после 15 мин инкубации	после 24 ч инкубации	после 15 мин инкубации	после 24 ч инкубации
Интактные клетки	0,35 (0,15-0,45)	0 (0-0,15)	0,05 (0-0,10)	0,45 (0,35-0,75)
Клетки после воздействия 10 мкМ NaHS	0,35 (0,30-0,45) p <sub>1</sub> >0,05	0 (0-0,05) p <sub>1</sub> >0,05	0 (0-0,20) p <sub>2</sub> >0,05	0,55 (0,30-0,70) p <sub>2</sub> >0,05
Клетки после воздействия 50 мкМ NaHS	0,30 (0,20-0,35) p <sub>1</sub> >0,05	0 (0-0,15) p <sub>1</sub> >0,05	0,1 (0-0,10) p <sub>2</sub> >0,05	1,05 (0,65-1,20) p <sub>2</sub> >0,05
Клетки после воздействия 100 мкМ NaHS	0,45 (0,35-0,55) p <sub>1</sub> >0,05	0,10 (0,05-0,25) p <sub>1</sub> >0,05	0 (0-0,10) p <sub>2</sub> >0,05	1,10 (0,80-1,30) p <sub>2</sub> >0,05
Клетки после воздействия 500 мкМ NaHS	0,45 (0,35-0,55) p <sub>1</sub> >0,05	0,15 (0,10-0,25) p <sub>1</sub> >0,05	0,10 (0-0,10) p <sub>2</sub> >0,05	0,20 (0-0,60) p <sub>2</sub> >0,05
Клетки после воздействия 10 мМ NaHS	0,15 (0,10-0,30) p <sub>1</sub> >0,05	2,30 (2,15-2,55) p <sub>1</sub> <0,05	0,05 (0-0,10) p <sub>2</sub> >0,05	59,10 (46,50-73,15) p <sub>2</sub> <0,05
Клетки после воздействия 50 мМ NaHS	0,15 (0,05-0,30) p <sub>1</sub> >0,05	5,60 (3,75-9,15) p <sub>1</sub> <0,05	0 (0-0,10) p <sub>2</sub> >0,05	89,90 (78,45-97,30) p <sub>2</sub> <0,05
Клетки после воздействия 100 мМ NaHS	0,20 (0,15-0,30) p <sub>1</sub> >0,05	13,30 (8,95-46,05) p <sub>1</sub> <0,05	0,10 (0-0,10) p <sub>2</sub> >0,05	97,95 (89,60-99,05) p <sub>2</sub> <0,05
Клетки после воздействия 500 мМ NaHS	0,30 (0,15-0,45) p <sub>1</sub> >0,05	50,60 (30,20-70,80) p <sub>1</sub> <0,05	0,15 (0,10-0,30) p <sub>2</sub> >0,05	100,00 (100,00-100,00) p <sub>2</sub> <0,05

Примечание (здесь и в табл. 15): p<sub>1</sub> - достоверность различий по сравнению с интактной культурой линии Jurkat; p<sub>2</sub> - достоверность различий по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров, n-число экспериментов

Далее время воздействия было увеличено до 24 ч. В результате 24-х часовой инкубации клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, с донором сульфида водорода в концентрациях 10, 50, 100, 500 мкМ достоверных различий, по сравнению с соответствующей интактной культурой клеток, не отмечалось (p>0,05).



Однако уже после добавления 10 мМ донора  $H_2S$  число клеток линии Jurkat с некротическими признаками увеличилось до 2,30(2,15-2,55)%, по сравнению с интактной культурой [0(0-0,15)%,  $p < 0,05$ ]. Добавление NaHS в указанных концентрациях к мононуклеарным лейкоцитам вызывала гибель 59,10(46,50-73,15)% клеток, что достоверно превышало соответствующие значения в контроле ( $p < 0,05$ ). Дальнейшее увеличение дозы донора сульфида водорода приводило к дозозависимому повышению количества клеток, гибнущих посредством некроза, как в культуре мононуклеарных лейкоцитов, так и в культуре клеток линии Jurkat ( $p < 0,05$ ) (табл. 14).

В проведенном нами исследовании интенсификация апоптотического процесса в культуре клеток линии Jurkat происходила при воздействии NaHS в концентрации 10, 50 и 100 мМ [9,70(8,83-14,90); 9,35(8,75-11,20) и 13,20(10,00-16,80)%, соответственно] в течение 15 мин, по сравнению с контрольными значениями ( $p < 0,05$ ). Воздействие донора сульфида водорода в концентрациях 10, 50 и 100 и 500 мкМ в течение 15 мин не влияло на программированную гибель клеток линии Jurkat ( $p > 0,05$ ). Мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров, были интактны к 15-ти минутному воздействию всех изученных доз донора сульфида водорода ( $p > 0,05$ ) (табл. 15). 24-х часовая инкубация с NaHS в конечной концентрации 10 и 50 мМ приводила к повышению числа аннексин-положительных клеток линии Jurkat по сравнению с аналогичными показателями в контроле [3,67(3,04-4,31); 5,32(4,75-5,94) и 1,05(0-1,55)%, соответственно ( $p > 0,05$ )]. Инкубация клеток Т-лимфобластной лейкемии с сульфидом водорода в концентрации 100 мМ сопровождалась увеличением количества апоптотически-измененных клеток [5,48(4,82-6,26)%], по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Число аннексин-положительных мононуклеарных лейкоцитов снижалось до 7,65(2,05-15,35)% при воздействии донора сульфида водорода в дозе 50 мМ и до 1,70(0,65-8,0)% при концентрации его 100 мМ, по сравнению с аналогичными значениями в контроле.

Таблица 15

Количество клеток с апоптотическими признаками в условиях повышения внутриклеточной концентрации сульфида водорода, (Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)), n=4

Условия инкубации	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками, %		Число мононуклеарных лейкоцитов с апоптотическими признаками, %	
	после 15 мин инкубации	после 24 ч инкубации	после 15 мин инкубации	после 24 ч инкубации
Интактные клетки	3,50 (2,70-4,20)	1,05 (0-1,55)	32,20 (18,80-35,40)	28,50 (24,85-29,30)
Клетки после воздействия 10 мкМ NaHS	3,50 (3,00-4,10) p <sub>1</sub> >0,05	1,10 (0,90-1,20) p <sub>1</sub> >0,05	20,50 (15,60-22,30) p <sub>1</sub> >0,05	25,20 (20,40-30,00) p <sub>1</sub> >0,05
Клетки после воздействия 50 мкМ NaHS	4,10 (3,90-4,50) p <sub>1</sub> >0,05	1,50 (1,00-2,10) p <sub>1</sub> >0,05	25,40 (16,30-30,10) p <sub>1</sub> >0,05	21,60 (20,50-29,50) p <sub>1</sub> >0,05
Клетки после воздействия 100 мкМ NaHS	3,60 (3,00-4,00) p <sub>1</sub> >0,05	1,35 (0,95-1,55) p <sub>1</sub> >0,05	24,40 (23,50-26,00) p <sub>1</sub> >0,05	19,80 (15,50-26,90) p <sub>1</sub> >0,05
Клетки после воздействия 500 мкМ NaHS	3,80 (3,50-4,20) p <sub>1</sub> >0,05	1,30 (1,25-1,35) p <sub>1</sub> >0,05	18,50 (10,60-23,50) p <sub>1</sub> >0,05	21,13 (19,80-22,65) p <sub>1</sub> >0,05
Клетки после воздействия 10 мМ NaHS	9,70 (8,83-14,90) p <sub>1</sub> <0,05	3,67 (3,04-4,31) p <sub>1</sub> <0,05	3,45 (0,45-7,60) p <sub>2</sub> <0,05	25,60 (15,25-39,05) p <sub>1</sub> >0,05
Клетки после воздействия 50 мМ NaHS	9,35 (8,75-11,20) p <sub>1</sub> <0,05	5,32 (4,75-5,94) p <sub>1</sub> <0,05	5,15 (0,55-11,13) p <sub>2</sub> <0,05	7,65 (2,05-15,35) p <sub>2</sub> <0,05
Клетки после воздействия 100 мМ NaHS	13,20 (10,00-16,80) p <sub>1</sub> <0,05	5,48 (4,82-6,26) p <sub>1</sub> <0,05	5,20 (2,10-16,80) p <sub>2</sub> <0,05	1,70 (0,65-8,0) p <sub>2</sub> <0,05

Таким образом, в результате проведенных исследований нами было определено оптимальное время воздействия (15 мин) и проапоптотическая доза донора сульфида водорода (10 мМ), не вызывающая значимого повышения количества некротических клеток линии Jurkat, и интактная для мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров.

### 3.2.2. Изучение вовлеченности p38 MAPK в регуляцию апоптотической реакции при изменении внутриклеточной концентрации сульфида водорода

На следующем этапе нашего исследования была проведена проверка гипотезы об участии p38 MAP киназы в трансдукции апоптогенного сигнала сульфида водорода в клетках линии Jurkat.

Ранее в экспериментальных условиях нами было показано, что инкубирование клеток линии Jurkat с NaHS в проапоптотической дозе, равной 10 мМ, вызывало достоверное увеличение числа апоптотически измененных клеток до 9,70(8,83-14,90)%, по сравнению с интактной культурой линии Jurkat ( $p < 0,05$ ). Предварительное добавление в культуральную среду SB 203580 (селективного ингибитора p38 MAPK) в концентрации 0,2 мкМ значительно уменьшало число клеток, вступивших в апоптоз, вплоть до значений, регистрируемых в интактной культуре [5,1(4,9-5,8)% и 3,5(2,7-4,2)%, соответственно,  $p < 0,05$ ] (рис. 21).

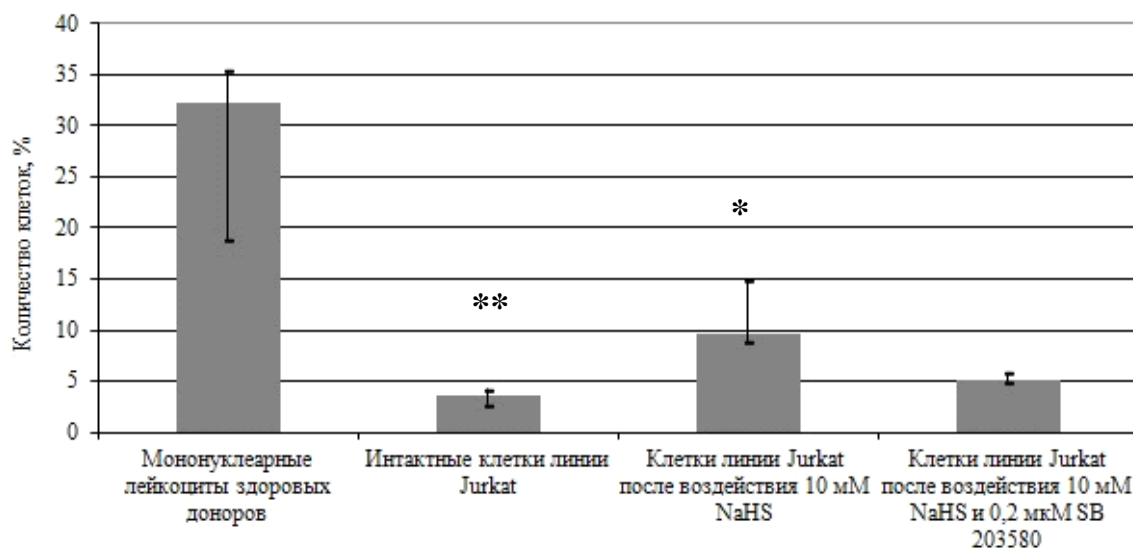


Рис. 21. Количество клеток с апоптотическими признаками в условиях ингибирования p38 MAP киназы и повышения внутриклеточной концентрации сульфида водорода, Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>), \*-достоверность различий по сравнению с интактными клетками линии Jurkat, \*\* -достоверность различий по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров

Полученные нами данные позволяют предположить вовлеченность p38 MAPK в NaHS-опосредованный апоптоз.

### 3.2.3. Особенности митохондриального трансмембранного потенциала при изменении внутриклеточной концентрации сульфида водорода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов

Для определения молекулярных механизмов NaHS-инициированного апоптоза нами была проведена оценка уровня митохондриального трансмембранного потенциала.

Инкубирование клеток линии Jurkat с NaHS в концентрации 10 мМ приводило к достоверному повышению количества клеток со сниженным трансмембранным потенциалом до 8,40 (7,80-20,60)% [1,10(0,70-1,20)% - в интактной культуре,  $p < 0,05$ ]. Предварительное ингибирование p38 MAPK также достоверно повышало значения изучаемого параметра [16,2 (15,0-21,5)%] по сравнению с интактной культурой ( $p < 0,05$ ); однако по сравнению с воздействием только 10 мМ NaHS достоверных различий выявлено не было ( $p > 0,05$ ) (рис. 22).

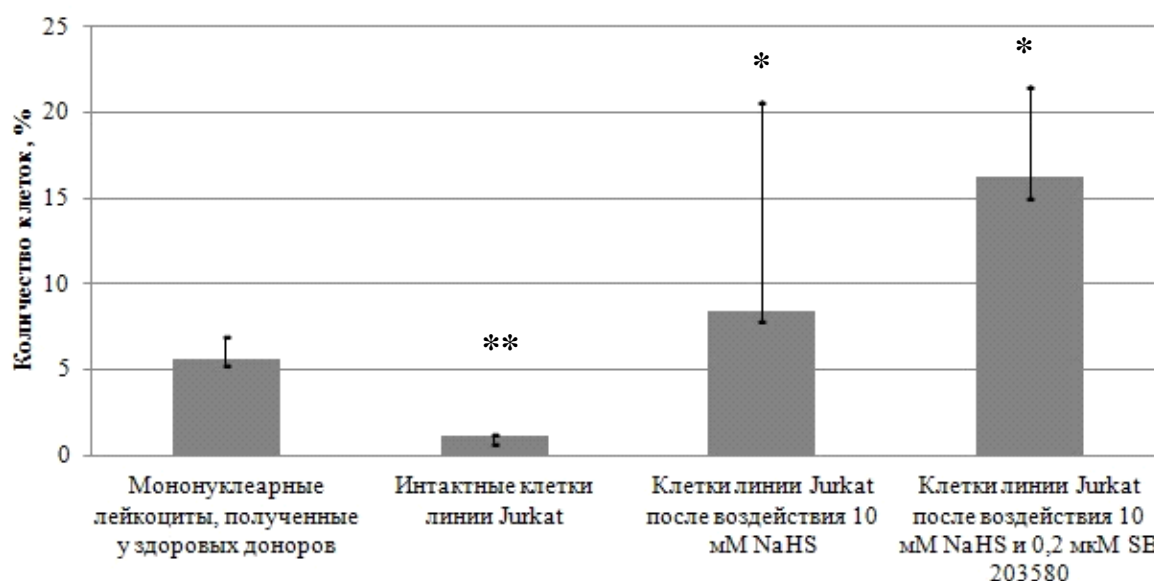


Рис. 22. Количество клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом в условиях повышения внутриклеточной концентрации сульфида водорода, Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>); \* - достоверность различий по сравнению с интактными клетками линии Jurkat, \*\* - достоверность различий по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что NaHS повышает количество клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом независимо от состояния p38 MAPK.

### 3.2.4. Оценка содержания белков-регуляторов апоптоза, функционирующих на уровне митохондрий при изменении внутриклеточной концентрации сульфида водорода и выключении р38 MAPK-зависимых механизмов

Для выяснения вклада белков семейства Bcl-2 в пермеабиллизацию митохондриальной мембраны нами было определено внутриклеточное содержание протеинов Bcl-2, Bcl-xL и Bad.

Добавление в культуральную среду проапоптотической концентрации донора сульфида водорода приводило к увеличению содержания белка Bcl-2 в культуре Т-лимфобластной лейкемии до 11,26(10,25-13,46) усл.ед. по сравнению с интактной культурой [2,17(1,87-2,48) усл.ед.,  $p < 0,05$ ], а предварительное ингибирование р38 киназы нивелировало эффект от воздействия донора сульфида водорода [2,54(1,44-3,64) усл.ед.,  $p < 0,05$ ] (рис. 23).

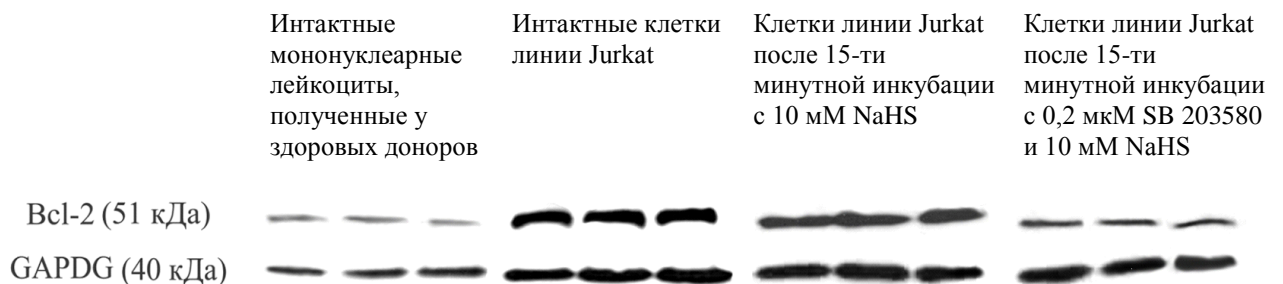


Рис. 23. Внутриклеточное содержание белка Bcl-2 в условиях воздействия донора сульфида водорода

Следовательно, повышение внутриклеточной концентрации сульфида водорода приводит к р38 MAPK-зависимому повышению содержания белка Bcl-2.

Инкубирование интактных и обработанных селективным ингибитором р38 киназы клеток линии Jurkat с NaHS в концентрации 10 мМ не приводило к изменению содержания белка Bcl-xL [14,29(12,86-16,34) и 15,67(12,07-19,27) усл.ед., соответственно], по сравнению с интактной культурой [10,21(7,72-12,70) усл.ед.,  $p > 0,05$ ] (рис. 24).

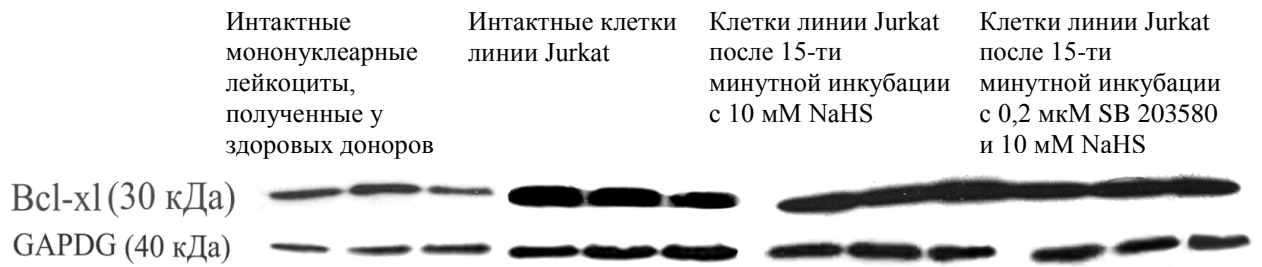


Рис. 24. Внутриклеточное содержание белка Vcl-xL в условиях воздействия донора сульфида водорода

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что содержание белка Vcl-xL не изменялось в ответ на повышение внутриклеточной концентрации сульфида водорода как на фоне активной, так и на фоне ингибированной p38 MAP киназы (табл. 25).

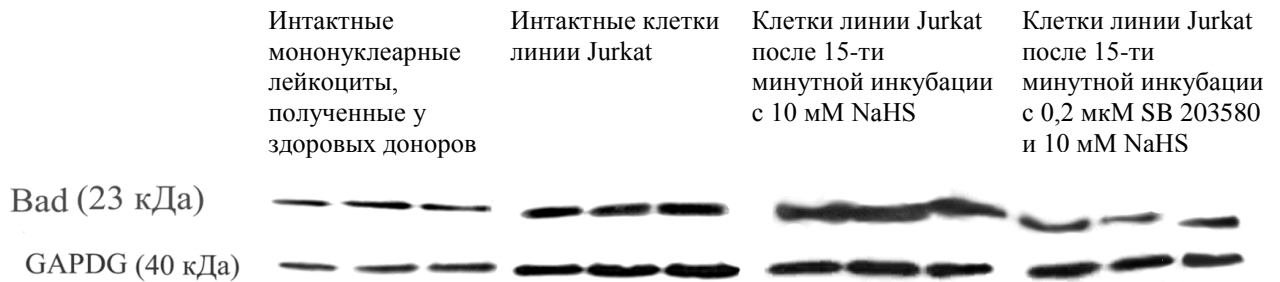


Рис. 25. Внутриклеточное содержание белка Bad в условиях воздействия донора сульфида водорода

Воздействие NaHS в проапоптотической концентрации на клетки линии Jurkat сопровождалось достоверным увеличением содержания белка Bad, по сравнению с интактной культурой [1,25(1,11-1,38) усл.ед.], до 6,04(5,62-6,11) усл.ед. ( $p < 0,05$ ); предшествующее выключение p38-зависимых путей отменяло указанный эффект донора сульфида водорода [2,22(2,12-2,32) усл.ед.,  $p < 0,05$ ] (рис. 25). Данные результаты свидетельствуют о p38 MAPK-зависимой способности сульфида водорода повышать содержание проапоптотического белка Bad.

Таким образом, изменения внутриклеточной концентрации сульфида водорода приводят к дисбалансу белков семейства Vcl-2. При этом описанное влияние сульфида водорода является p38 MAPK-зависимым.

### 3.2.5 Особенности экспрессии мРНК белков-регуляторов апоптоза, функционирующих на уровне митохондрий при изменении внутриклеточной концентрации сульфида водорода и выключении р38 MAPK-зависимых механизмов

Для выяснения влияния сульфида водорода на экспрессию ключевых генов белков-регуляторов апоптоза (*bcl-2*, *bcl-xl*, *bad* и *bax*) нами был определен уровень соответствующих мРНК (табл. 16).

Таблица 16

Экспрессия генов семейства *bcl-2* (усл. ед.) при инкубации в условиях повышения внутриклеточной концентрации сульфида водорода, ( $Me(Q_1-Q_3)$ )

Условия инкубации	Экспрессия гена <i>bcl-2</i> , усл.ед.	Экспрессия гена <i>bcl-xl</i> , усл.ед.	Экспрессия гена <i>bad</i> , усл.ед.	Экспрессия гена <i>bax</i> , усл.ед.
Мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров	5,84 (5,35-6,12)	9,92 (9,76-13,33)	3,10 (2,47-3,19)	0,91 (0,85-1,35)
Интактные клетки линии Jurkat	2,36 (2,15-2,41) $p_1 < 0,05$	1,40 (1,21-3,65) $p_1 < 0,05$	1,30 (0,89-1,92) $p_1 < 0,05$	0,42 (0,37-0,49) $p_1 < 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 10 мМ NaHS	2,68 (1,94-3,17) $p_2 > 0,05$	1,57 (1,39-1,76) $p_2 > 0,05$	3,75 (3,50-3,93) $p_2 < 0,05$	0,20 (0,16-0,37) $p_2 > 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 10 мМ NaHS и 0,2 мкМ SB 203580	2,63 (2,46-3,59) $p_2 > 0,05$	5,17 (4,80-5,56) $p_2 < 0,05$	1,36 (1,27-1,59) $p_2 > 0,05$	0,002 (0,001-0,003) $p_2 < 0,05$

Примечание (здесь и в табл.17):  $p_1$  - достоверность различий по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров;  $p_2$  - достоверность различий по сравнению с интактной культурой линии Jurkat

Инкубирование клеток линии Jurkat в условиях добавления в культуральную среду 10мМ NaHS, а также при внесении селективного ингибитора р38 киназы клеток приводило к статистически значимому снижению уровня мРНК *bcl-2* по сравнению с интактной культурой [2,68(1,94-3,17) и 2,63(2,46-3,5) усл.ед., при значениях в интактной культуре 5,84 (5,35-6,12) усл.ед., соответственно,  $p < 0,05$ ]. Следовательно, NaHS является негативным р38 MAPK-независимым регулятором экспрессии гена *bcl-2* в клетках линии Jurkat (табл. 16). Изолированное воздействие на клетки Т-лимфобластного лейкоза NaHS в дозе 10 мМ и совместное культивирование

клеток с SB 203580 в дозе 0,2 мкМ и NaHS в дозе 10 мМ приводило к достоверному снижению уровня мРНК гена *bcl-x1* до 1,57(1,39-1,76) и 5,17(4,80-5,56) усл.ед., соответственно, по сравнению с интактной культурой (9,92(9,76-13,33) усл.ед.,  $p < 0,05$ ) (табл. 16). При этом в условиях изолированного действия газа уровень мРНК был ниже, по сравнению с воздействием его на фоне блокированной p38 MAPK ( $p < 0,05$ ). Разумно предположить, что повышение внутриклеточного содержания сульфида водорода приводит к снижению уровня мРНК гена *bcl-x1*, однако, стоит отметить, что воздействие NaHS на фоне блокирования p38 MAPK все же вызывает повышение содержания мРНК исследуемого гена по сравнению с изолированным воздействием NaHS. Это дает основание считать действующими p38-зависимые механизмы регуляции экспрессии гена *bcl-x1*, реализуемые с участием сульфида водорода.

Воздействие NaHS в концентрации 10 мМ на клетки линии Jurkat не приводило к изменению экспрессии мРНК гена *bad* [3,75(3,50-3,93) усл.ед.] относительно контрольных значений [3,10(2,47-3,19) усл.ед.,  $p > 0,05$ ]. Воздействие указанной концентрации донора сульфида водорода на культуру клеток линии Jurkat с ингибированной p38 MAPK приводило к достоверному снижению уровня мРНК гена *bad* [1,36(1,27-1,59) усл.ед.], по сравнению с интактной культурой и клетками после изолированного действия газа ( $p < 0,05$ ) (табл.16). Полученные данные свидетельствуют о том, что, по всей видимости, NaHS не является регулятором экспрессии гена *bad*, однако, воздействие на клетки на фоне предварительного ингибирования p38 MAPK подавляет экспрессию изучаемого гена.

Достоверное угнетение экспрессии гена *baх* до 0,20(0,16-0,37) усл.ед., по сравнению с интактной культурой Т-лимфобластного лейкоза, вызывало культивирование клеток с 10 мМ NaHS ( $p < 0,05$ ), а предварительное ингибирование p38 киназы приводило к отсутствию экспрессии изучаемого гена (табл. 16). Выявленные закономерности говорят о том, что донор сульфида водорода является негативным регулятором экспрессии гена *baх*.



Ингибирование p38 MAPK усиливает эффект сульфида водорода на экспрессию гена *bax*, полностью ее блокируя.

Таким образом, повышение внутриклеточной концентрации сульфида водорода является негативным регулятором экспрессии генов (*bcl-2*, *bcl-x1* и *bax*) и не участвует в регуляции гена *bad*. Часть указанных эффектов является p38-зависимыми.

### 3.2.6. Оценка экспрессии генов и содержания, кодируемых ими белков-ингибиторов каспаз, при изменении внутриклеточной концентрации сульфида водорода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов

Далее нами было изучено влияние экзогенного сульфида водорода на содержание белков-ингибиторов каспаз и соответствующих им транскриптов.

Добавление донора сульфида водорода в концентрации 10 мМ к культуре клеток линии Jurkat вызывало достоверное снижение уровня мРНК гена *xIAP* до 0,20(0,19-0,21) усл.ед., по сравнению с интактной культурой [4,97(4,88-5,40) усл.ед.,  $p < 0,05$ ] (табл. 17).

Таблица 17

Экспрессия генов *Aven* и *xIAP* (усл. ед.) при инкубации в условиях повышения внутриклеточной концентрации сульфида водорода, Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

Условия инкубации	Экспрессия гена <i>Aven</i> , усл.ед.	Экспрессия гена <i>xIAP</i> , усл.ед.
Мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров	5,17 (5,02-5,36)	6,07 (4,87-7,98)
Интактные клетки линии Jurkat	1,99 (1,63-2,0) $p_1 < 0,05$	4,97 (4,88-5,4) $p_1 > 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 10 мМ NaHS	0,26 (0,22-0,28) $p_2 < 0,05$	0,20 (0,19-0,21) $p_2 < 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 10 мМ NaHS и 0,2 мкМ SB 203580	0,40 (0,36-0,53) $p_2 < 0,05$	0,17 (0,17-0,2) $p_2 < 0,05$

Совместная инкубация клеток с проапоптотической концентрацией донора сульфида водорода и SB203580 в концентрации 0,2 мкМ приводила к снижению уровня мРНК гена  $\chi$ IAP до 0,17(0,17-0,20) усл.ед., по сравнению с интактной культурой ( $p < 0,05$ ), не отличаясь от такового при изолированном действии газа ( $p > 0,05$ ) (табл. 17).

При инкубировании клеток линии Jurkat с NaHS в концентрации 10 мМ не было выявлено достоверных изменений содержания белка  $\chi$ IAP [14,64(13,63-16,09) усл.ед.], по сравнению с интактной культурой [15,57(14,29-16,84) усл.ед.,  $p > 0,05$ ] (рис. 27). Данное воздействие на фоне блокирования p38 MAP киназы также не приводило к достоверному изменению содержания  $\chi$ IAP [10,97(6,85-15,08) усл.ед.], по сравнению с контрольными значениями (интактная культура) ( $p > 0,05$ ), а также по сравнению с таковыми при изолированном действии газа ( $p > 0,05$ ) (рис. 27). При инкубировании клеток линии Jurkat с NaHS в концентрации 10 мМ экспрессия гена Aven значимо снижалась - до 0,26(0,22-0,28) усл.ед., по сравнению с интактной культурой [1,99(1,63-2,0) усл.ед.,  $p < 0,05$ ].

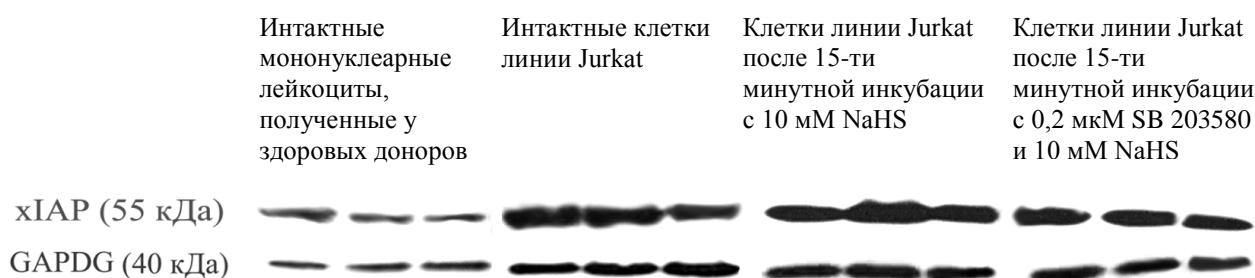


Рис. 27. Внутриклеточное содержание белка  $\chi$ IAP в условиях воздействия донора сульфида водорода

Предварительная инкубация клеток Т-лимфобластного лейкоза с селективным ингибитором p38 MAPK достоверно снижала  $H_2S$ -индуцированную экспрессию гена Aven - до 0,4(0,36-0,53) усл.ед., по сравнению с интактной культурой ( $p < 0,05$ ). При этом различия между группами с активной и ингибированной p38 MAP киназой отсутствовали ( $p > 0,05$ ) (табл. 17).

Добавление к культуре клеток линии Jurkat NaHS в дозе 10 мМ не приводило к достоверным изменениям уровня белка Aven [1,04(0,99-2,08) усл.ед.], по сравнению с интактной культурой ( $p>0,05$ ). Воздействие NaHS в концентрации 10 мМ на клетки линии Jurkat, предварительно обработанные селективным ингибитором p38 MAP киназы, сопровождалось достоверным увеличением содержания белка Aven - до 9,03(4,32-13,73) усл. ед. как по сравнению с интактной культурой ( $p<0,05$ ), так и по сравнению с изолированным действием газа ( $p<0,05$ ) (рис. 28).

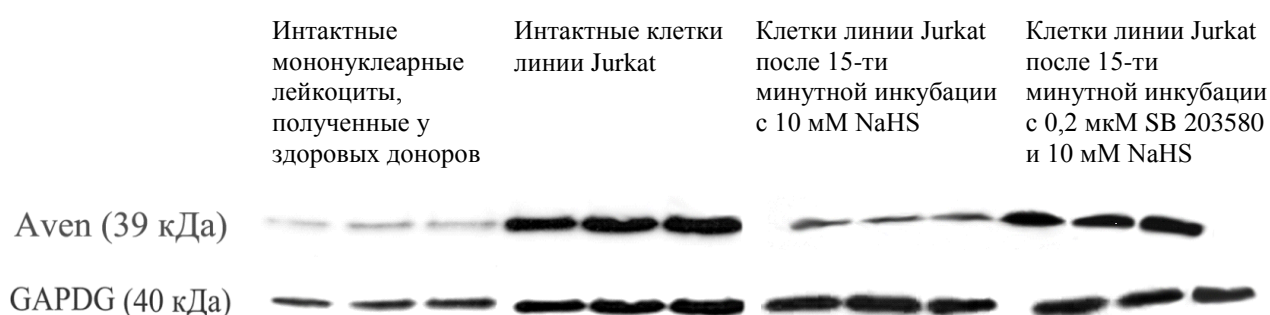


Рис. 28. Внутриклеточное содержание белка Aven в условиях воздействия донора сульфида водорода

Так, в результате наших исследований было показано, что 15-ти минутная инкубация клеток линии Jurkat с NaHS вызывает p38-независимое снижение экспрессии генов *xiap* и *aven*, при этом содержание соответствующих белков не изменялось. Вместе с тем при ингибировании p38 содержание белка Aven повышалось, а содержание белка *xIAP* - снижалось.

### 3.2.7. Оценка активности каспазы-3 и -9 при изменении внутриклеточной концентрации сульфида водорода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов

Далее в рамках настоящего исследования нами была проведена оценка активности каспазы-3 и -9 (табл. 18). Увеличение внутриклеточной концентрации сульфида водорода в клетках линии Jurkat сопровождалось достоверным повышением активности как каспазы-3, так и каспазы-9

[1,64(1,59-1,68) и 2,71(2,69-2,74) усл.ед., соответственно], по сравнению с таковым в интактных клетках линии Jurkat ( $p < 0,05$ ).

Таблица 18

Активность каспаз-3 и -9 в клетках линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах в условиях воздействия донора сульфида водорода, (Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Условия инкубации	Активность каспазы-3, усл.ед.	Активность каспазы-9, усл.ед.
Интактные клетки линии Jurkat	1,00 (0,99-1,01)	1,00 (0,99-1,01)
Мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров	0,72 (0,71-0,73) $p < 0,05$	1,40 (1,30-1,50) $p < 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 10 мМ NaHS	1,64 (1,59-1,68) $p < 0,05$	2,71 (2,69-2,74) $p < 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия 10 мМ NaHS и 0,2 мкМ SB 203580	2,08 (1,99-2,13) $p < 0,05$	2,19 (2,13-2,24) $p < 0,05$

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с интактной культурой линии Jurkat

Воздействие на клетки Т-лимфобластного лейкоза донора сульфида водорода на фоне ингибирования p38 киназы приводило к достоверному повышению активности каспазы-3 [(2,08(1,99-2,13) усл.ед.] как по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ), так и относительно клеток, подвергшихся изолированному воздействию NaHS ( $p < 0,05$ ). Активность каспазы-9 при сочетанном воздействии донора сульфида водорода и ингибитора p38 MAPK оказалась достоверно повышена, по сравнению с контролем [2,19(2,13-2,24) усл.ед.,  $p < 0,05$ ], но при этом была достоверно снижена относительно аналогичного соответствующего значения, зафиксированного в клетках, культивированных только с NaHS в дозе 10 мМ ( $p < 0,05$ ) (табл. 18).

Таким образом, по итогам проведенного исследования было установлено, что повышение внутриклеточной концентрации сульфида водорода вызывало возрастание активности каспазы-3 и -9, частично вовлекая в этот процесс p38 MAPK.

### 3.2.8. Оценка количества клеток, экспрессирующих TNFR1, и уровня TNF $\alpha$ в супернатантах культур клеток при изменении внутриклеточной концентрации сульфида водорода и выключении р38 MAPK-зависимых механизмов

Помимо митохондриального пути инициации апоптоза, в нашем исследовании проводилась оценка рецептор-опосредованного пути запуска программированной гибели клеток (рис. 29).

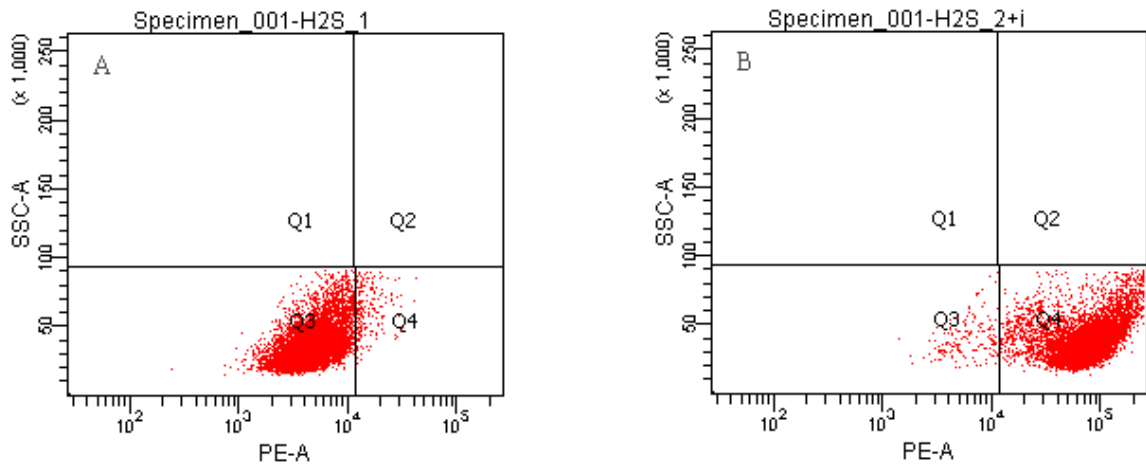


Рис. 29. Оценка количества TNFR1+-клеток (Q4) при: А – культивировании клеток со 10 мМ NaHS; В – культивировании клеток с 0,265 мкМ SB 203580 и 10 мМ NaHS

При анализе количества TNFR1-положительных клеток в культуре Т-лимфобластной лейкемии, в условиях экспериментального изменения внутриклеточной концентрации сульфида водорода было установлено, что относительное содержание TNFR1+-клеток [3,90(2,30-4,95)%] не отличалось ( $p > 0,05$ ) от таковых в интактной культуре. Инкубирование клеток линии Jurkat с селективным химическим ингибитором р38 MAPK приводило к достоверному возрастанию количества клеток, несущих на своей мембране рецепторы к TNF- $\alpha$  [91,50(88,65-93,75)%], по сравнению со значениями, регистрируемыми в интактной культуре ( $p < 0,05$ ) и в клетках после воздействия NaHS ( $p < 0,05$ ).

Добавление в культуральную среду проапоптотической дозы донора сульфида водорода приводило к снижению продукции TNF $\alpha$  клетками линии Jurkat по сравнению с соответствующими значениями в интактной культуре клеток [3,1(1,8-4,3) и 11,7(10,8-12,4) пг/мл, соответственно] ( $p < 0,05$ ).

Указанные изменения исследуемого показателя сохранялись при ингибировании p38 MAP киназы [3,1(1,5-4,6) пг/мл].

Таким образом, повышение внутриклеточной концентрации сульфида водорода не сопровождается изменением количества клеток, экспрессирующих на своей поверхности рецепторы к TNF $\alpha$ ; p38 MAPK в данном случае проявляет антиапоптотические свойства, подавляя экспрессию рецепторов смерти. Продукция самого цитокина при этом снижалась в независимой от активности p38 манере.

### **3.3. Особенности реализации запрограммированной гибели клеток линии Jurkat в условиях воздействия донора монооксида углерода *in vitro***

#### **3.3.1. Определение дозы и времени воздействия донора монооксида углерода, способной модулировать апоптоз клеток**

На первом этапе оценки роли CO на апоптоз нами была определена минимальная токсическая доза донора монооксида углерода (CORM-2) для клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов крови, выделенных у здоровых доноров. В таблицах 19 и 20 представлены результаты оценки выживаемости клеток при инкубации с различными концентрациями CORM-2 в течение 15 мин и 24 ч. При инкубировании клеток с донором монооксида углерода в течение 15 мин статистически значимых различий в количестве клеток линии Jurkat, вступивших в некроз, во всех группах исследования выявлено не было [0,35(0,15-0,45)% - в интактных клетках и 0,70(0,60-0,80)%; 0,70(0,50-1,00)%; 1,10(1,00-1,20)% при изменении концентрации CO] ( $p > 0,05$ ). При действии изучаемых доз донора монооксида углерода в изучаемых дозах на мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров, количество клеток с некротическими изменениями оказалось достоверно повышенным только при инкубации с CORM-2 в концентрации 100 мкМ [8,53(2,25-12,30)%], по сравнению с интактными мононуклеарными лейкоцитами ( $p < 0,05$ ).

Количество клеток с некротическими признаками в условиях повышения внутриклеточной концентрации монооксида углерода,  $Me(Q_1-Q_3)$ ,  $n=4$

Условия инкубации	Число клеток линии Jurkat с некротическими признаками, %		Число мононуклеарных лейкоцитов с некротическими признаками, %	
	после 15 мин инкубации	после 24 ч инкубации	после 15 мин инкубации	после 24 ч инкубации
Интактные клетки	0,35 (0,15-0,45)	0 (0-0,15)	0,50 (0-0,10)	0,45 (0,35-0,75)
Клетки после воздействия 50 мкМ CORM-2	0,70 (0,60-0,80) $p_1 > 0,05$	2,10 (1,70-2,35) $p_1 < 0,05$	0,60 (0,30-0,90) $p_2 > 0,05$	7,00 (3,25-9,50) $p_2 < 0,05$
Клетки после воздействия 100 мкМ CORM-2	0,70 (0,50-1,00) $p_1 > 0,05$	8,50 (7,75-9,00) $p_1 < 0,05$	8,53 (2,25-12,30) $p_2 < 0,05$	41,10 (39,30-42,90) $p_2 < 0,05$
Клетки после воздействия 500 мкМ CORM-2	1,10 (1,00-1,20) $p_1 > 0,05$	92,90 (90,80-96,90) $p_1 < 0,05$	-	-

Примечание (здесь и в табл. 20):  $p_1$  - достоверность различий по сравнению с интактной культурой линии Jurkat;  $p_2$  - достоверность различий по сравнению с интактными мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров,  $n$ -число экспериментов

При воздействии дозы донора CO в концентрации 50 мкМ статистически значимых различий, по сравнению с интактными клетками, выявлено не было [0,60(0,30-0,90)% и 0,50(0-0,10)%, соответственно,  $p > 0,05$ ]. При 24-х часовом воздействии донора монооксида углерода в изучаемых концентрациях на клетки линии Jurkat было выявлено достоверное дозозависимое повышение количества некротически измененных клеток по сравнению с интактной культурой [2,10(1,70-2,35)% - при действии CORM-2 в концентрации 50 мкМ; 8,50(7,75-9,00)% - в дозе 100 мкМ, и 92,90(90,80-96,90)% - в дозе 500 мкМ] ( $p < 0,05$ ). Поскольку действие донора CO в концентрации 500 мкМ вызывало некроз более 50% клеток линии Jurkat при 24-х часовой инкубации, данная концентрация не использовалась в дальнейшем для изучения дозозависимого влияния CO на гибель мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров.

Мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров, отвечали на 24-х часовое воздействие CORM-2 в изучаемых дозах дозозависимым повышением количества некротически измененных клеток, по сравнению с интактными мононуклеарными лейкоцитами ( $p < 0,05$ ) (табл. 19).

Далее методом проточной цитофлуориметрии нами было определено количество аннексин-положительных клеток при воздействии на них донора монооксида углерода в различных дозах (табл. 20).

Инкубирование клеток линии Jurkat в течение 15 мин с донором монооксида углерода в дозах 50 и 100 мкМ не вызывало достоверных изменений количества клеток, вступивших в апоптоз, по сравнению с аналогичным показателем, зарегистрированным в интактной культуре ( $p > 0,05$ ) (табл. 20). Воздействие CORM-2 в дозе 500 мкМ в течение 15 мин на клетки линии Jurkat вызывало достоверное увеличение количества апоптотически измененных клеток [8,60(8,30-9,10)%,  $p < 0,05$ ], по сравнению с интактными клетками линии Jurkat.

Таблица 20

Количество клеток с апоптотическими признаками в условиях повышения внутриклеточной концентрации монооксида углерода, ( $Me(Q_1-Q_3)$ ),  $n=4$

Условия инкубации	Число клеток линии Jurkat с апоптотическими признаками, %		Число мононуклеарных лейкоцитов с апоптотическими признаками, %	
	после 15 мин инкубации	после 24 ч инкубации	после 15 мин инкубации	после 24 ч инкубации
Интактные клетки	3,50 (2,70-4,20)	1,05 (0-1,55)	32,20 (18,80-35,40)	28,50 (24,85-29,30)
Клетки после воздействия 50 мкМ CORM-2	7,00 (5,30-8,00) $p_1 < 0,05$	9,60 (8,90-10,10) $p_1 < 0,05$	6,17 (5,45-7,00) $p_2 < 0,05$	30,94 (28,62-33,47) $(p_2 > 0,05)$
Клетки после воздействия 100 мкМ CORM-2	6,80 (5,40-7,80) $p_1 < 0,05$	37,30 (35,80-39,60) $p_1 < 0,05$	12,70 (9,90-15,00) $p_2 < 0,05$	40,30 (38,10-41,50) $p_2 < 0,05$
Клетки после воздействия 500 мкМ CORM-2	8,60 (8,30-9,10) $p_1 < 0,05$	5,40 (2,70-6,90) $p_1 < 0,05$	-	-

Добавление CORM-2 в дозах 50 и 100 мкМ в культуральную среду мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, приводило к



достоверному снижению количества аннексин-положительных клеток до 6,17(5,45-7,00) и 12,70(9,90-15,00)%, соответственно, по сравнению с интактными клетками ( $p < 0,05$ ) (табл.20). Увеличение времени инкубации клеток линии Jurkat с донором монооксида углерода до 24 ч приводило к достоверному увеличению количества клеток, экспрессирующих на своей поверхности фосфатидилсерин [9,60(8,90-10,10)% - при воздействии в дозе 50 мкМ и 37,30(35,80-39,60)% - дозе 100 мкМ,  $p < 0,05$ ]. При добавлении в культуральную среду мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, CORM-2 в дозе 50 мкМ достоверно не изменялось; при воздействии CORM-2 в концентрации 100 мкМ количество клеток, вступивших в апоптоз, достоверно увеличивалось до 40,30(38,10-41,50)%, по сравнению с интактными мононуклеарными лейкоцитами ( $p < 0,05$ ) (табл. 20).

Таким образом, достоверное повышение количества клеток линии Jurkat, вступивших в апоптоз, происходит при 24-х часовой инкубации с CORM-2 в дозах 50 и 100 мкМ. Инкубация мононуклеарных лейкоцитов со CORM-2 в дозе 100 мкМ в течение 24 ч вызывала 7-кратное повышение числа клеток с некротическими признаками. Далее для оценки молекулярных механизмов дисрегуляции апоптоза с участием монооксида углерода использовалась концентрация CORM-2 равная 50 мкМ.

### **3.3.2. Изучение вовлеченности p38 MAPK в регуляцию апоптотической реакции при изменении внутриклеточной концентрации монооксида углерода**

Проведенная ранее оценка апоптоза клеток линии Jurkat при добавлении в среду инкубации CORM-2 в концентрации 50 мкМ показала, что относительное количество FITC<sup>+</sup>-клеток в 1,5 раза превышало их число в интактной культуре [9,60(8,90-10,10) и 3,50(2,70-4,20)%, соответственно,  $p < 0,05$ ]. Ингибирование p38-зависимых путей приводило к достоверному увеличению числа апоптотических клеток до 22,90(19,90-28,00)%, по сравнению с культурой, инкубированной только с CORM-2 (рис. 30).

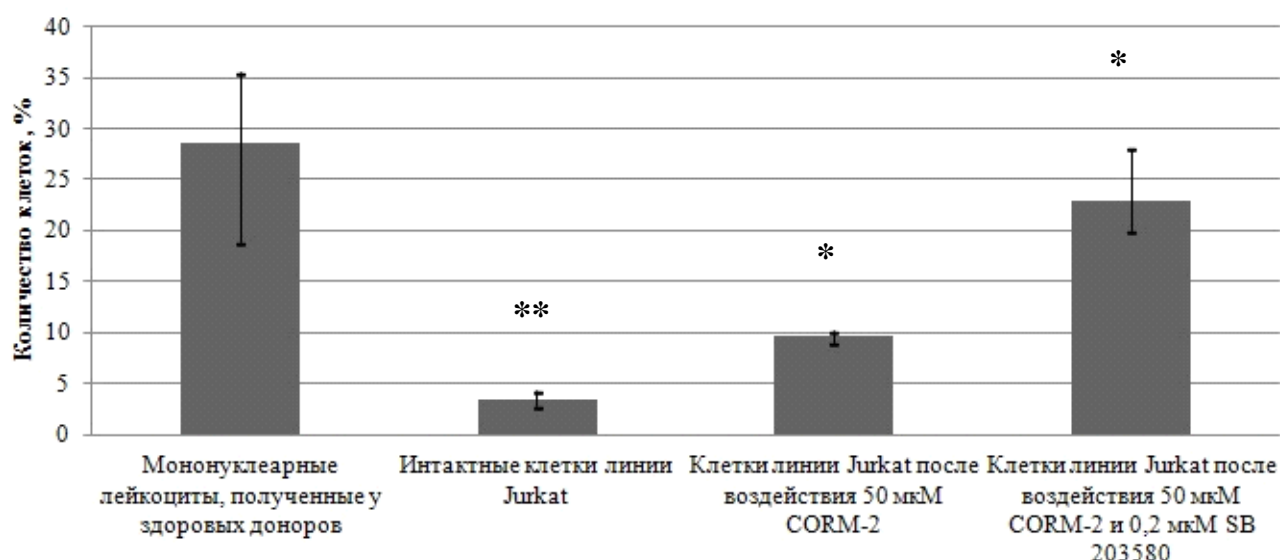


Рис. 30. Количество клеток с апоптотическими признаками в условиях ингибирования p38 MAP киназы и повышения внутриклеточной концентрации монооксида углерода, (Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)); \* - достоверность различий по сравнению с интактными клетками линии Jurkat, \*\* - достоверность различий по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров

Таким образом, p38 MAPK проявляет антиапоптотические свойства на фоне повышения внутриклеточной концентрации монооксида углерода.

### 3.3.3. Особенности митохондриального трансмембранного потенциала при изменении внутриклеточной концентрации монооксида углерода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов

Оценка числа клеток со сниженным  $\Delta\psi$  в культуре клеток линии Jurkat после воздействия CORM-2 в концентрации 50 мкМ установила, что значения данного показателя достоверно превышали соответствующие параметры в интактной культуре [16,40(15,90-18,50) и 1,10(0,70-1,20)% соответственно,  $p < 0,05$ ] (рис. 31).

Добавление CORM-2 в дозе 50 мкМ в культуру клеток с предварительно ингибированной p38 MAPK приводило к достоверному повышению количества клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом - до 30,30(29,10-30,40)%, по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) и таковым при изолированном действии газа ( $p < 0,05$ ) (рис. 31).

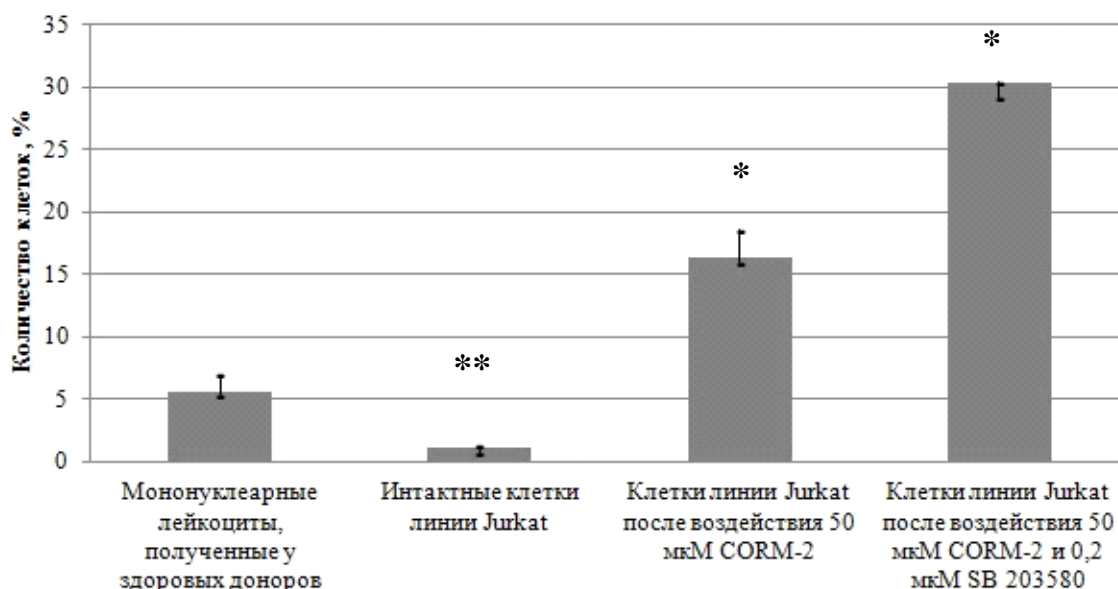


Рис. 31. Количество клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом в условиях ингибирования p38 MAP киназы и повышения внутриклеточной концентрации монооксида углерода, (Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)); \*-достоверность различий по сравнению с интактными клетками линии Jurkat, \*\*-достоверность различий по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров

Таким образом, повышение внутриклеточной концентрации монооксида углерода приводит к падению трансмембранного митохондриального потенциала. Кроме того, полученные результаты подтверждают выдвинутое ранее предположение об антиапоптотических свойствах p38 MAP киназы в контексте повышения внутриклеточной концентрации монооксида углерода.

### 3.3.4. Изменения содержания белков семейства Bcl-2 при повышении внутриклеточной концентрации монооксида углерода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов

Добавление в среду инкубации интактной культуры клеток линии Jurkat CORM-2 в концентрации 50 мкМ приводило к достоверному снижению содержания белка Bcl-2 до 1,13(0,80-1,47) усл.ед. [в интактной культуре клеток - 2,17(1,87-2,48) усл.ед.,  $p < 0,05$ ]. Внесение в среду инкубации клеток CORM-2 наряду с ингибитором p38 киназы, сопровождалось достоверным повышением содержания белка Bcl-2 [15,07(13,68-16,46) усл.ед.] как по сравнению с интактной культурой

( $p < 0,05$ ), так и по сравнению с изолированным действием газа ( $p < 0,05$ ) (рис. 32).

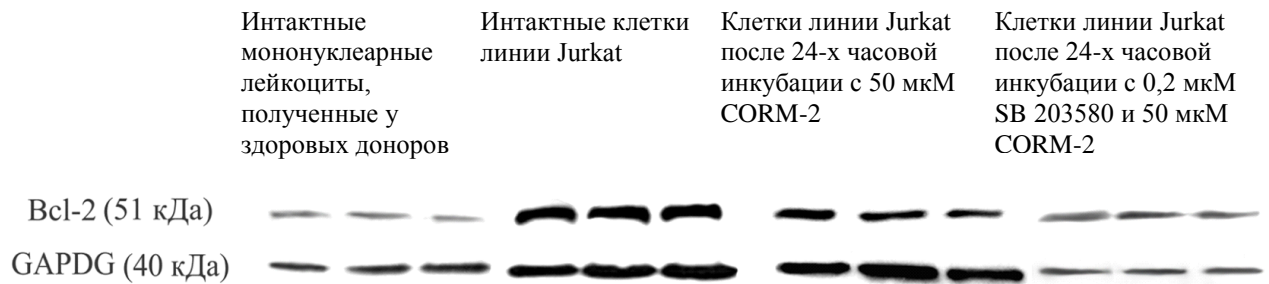


Рис. 32. Внутриклеточное содержание белка Bcl-2 в условиях воздействия донора монооксида углерода

При добавлении в интактную культуру Т-лимфобластной лейкемии CORM-2 в дозе 50 мкМ содержание белка Bcl-xL достоверно снижалось - до 1,23(0,86-1,59) усл.ед., по сравнению с интактной культурой [10,21(7,72-12,70) усл.ед.,  $p < 0,05$ ]. Инкубирование клеток линии Jurkat совместно с ингибитором p38 MAP киназы и CORM-2 в концентрации 50 мкМ не приводило к достоверному изменению содержания Bcl-xL [9,08(7,05-11,12) усл.ед.,  $p > 0,05$ ] по сравнению с контролем, однако было статистически значимо повышенным по сравнению с таковыми в условиях изолированного воздействия CORM-2 ( $p < 0,05$ ) (рис. 33).

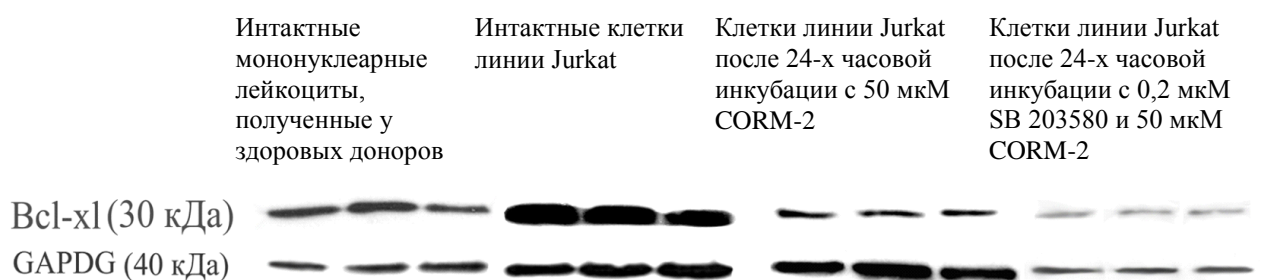


Рис. 33. Внутриклеточное содержание белка Bcl-xL в условиях воздействия донора монооксида углерода

Действие CORM-2 в концентрации 50 мкМ на клетки линии Jurkat сопровождалось достоверным повышением содержания белка Bad [7,33(5,99-8,67) усл.ед.] по сравнению с интактной культурой клеток линии Jurkat

[1,25(1,11-1,38) усл.ед.,  $p < 0,05$ ]. Ингибирование p38 MAPK и действие CORM-2 в дозе 50 мкМ также приводило к достоверному повышению содержания Bad [27,34(22,73-31,95) усл.ед.] как по сравнению с интактной культурой, так и с культурой, инкубированной только с CORM-2 в концентрации 50 мкМ ( $p < 0,05$ ) (рис. 34).

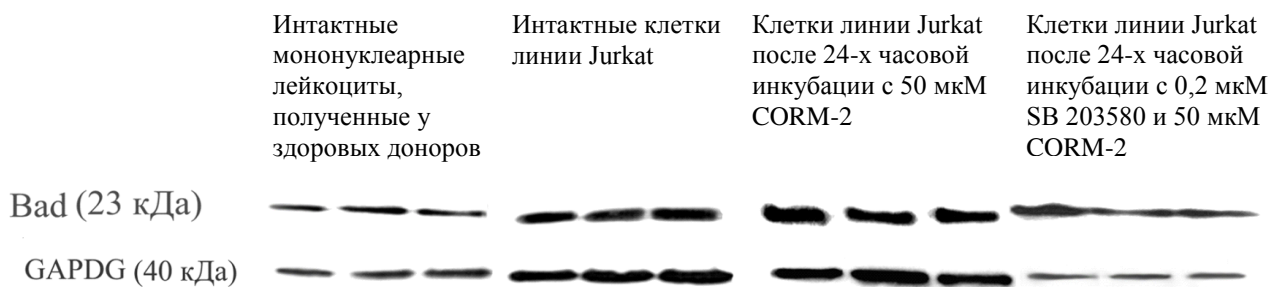


Рис. 34. Внутриклеточное содержание белка Bad в условиях воздействия донора монооксида углерода

Таким образом, действие CORM-2 (донора монооксида углерода) *in vitro* в апоптозиндуцирующей концентрации на клетки линии Jurkat имело место нарушение баланса белков семейства Bcl-2: содержание антиапоптотических протеинов Bcl-2 и Bcl-xL снижалось, содержание проапоптотического протеина Bad - повышалось. В случае выключения p38 MAPK-зависимых путей *in vitro* содержание белка Bcl-2 повышалось, содержание белка Bcl-xL приближалось к контрольному значению, а содержание проапоптотического белка Bad превышало как контрольные значения, так и соответствующий его уровень при изолированном воздействии донора монооксида углерода.

### 3.3.5 Особенности экспрессии генов белков семейства Bcl-2 при изменении внутриклеточной концентрации монооксида углерода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов

Результаты, полученные в ходе определения экспрессии исследуемых генов методом ПЦР в «реальном времени», представлены в таблице 21.

Экспрессия генов белков семейства Bcl-2 при инкубации  
в условиях повышения внутриклеточной концентрации  
монооксида углерода, (Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Условия инкубации	Экспрессия гена bcl-2, усл.ед.	Экспрессия гена bcl-x1, усл.ед.	Экспрессия гена bad, усл.ед.	Экспрессия гена bax, усл.ед.
Мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров	5,84 (5,35-6,12)	9,92 (9,76-13,33)	3,10 (2,47-3,19)	0,91 (0,85-1,35)
Интактные клетки линии Jurkat	2,36 (2,15-2,41) p <sub>1</sub> <0,05	1,40 (1,21-3,65) p <sub>1</sub> <0,05	1,30 (0,89-1,92) p <sub>1</sub> <0,05	0,42 (0,37-0,49) p <sub>1</sub> <0,05
Клетки линии Jurkat после воздействия 50 мкМ CORM-2	2,90 (1,51-4,78) p <sub>2</sub> >0,05	3,36 (2,92-3,99) p <sub>2</sub> <0,05	1,24 (0,75-1,64) p <sub>2</sub> >0,05	0,76 (0,41-1,17) p <sub>2</sub> >0,05
Клетки линии Jurkat после воздействия 50 мкМ CORM-2 и 0,2 мкМ SB 203580	4,04 (4,01-5,29) p <sub>2</sub> <0,05	6,95 (5,88-6,96) p <sub>2</sub> <0,05	1,81 (1,72-2,49) p <sub>2</sub> >0,05	0,48 (0,45-0,85) p <sub>2</sub> >0,05

Примечание: p<sub>1</sub> - достоверность различий по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров; p<sub>2</sub> - достоверность различий по сравнению с интактной культурой линии Jurkat

Культивирование интактных клеток линии Jurkat с CORM-2 в концентрации 50 мкМ, а также клеток с ингибированной p38 киназой не приводило к достоверным изменениям экспрессии гена bcl-2 [2,90(1,51-4,78) и 4,04(4,01-5,29) усл.ед. соответственно], по сравнению с таковой в интактной культуре клеток линии Jurkat [5,84(5,35-6,12) усл.ед., p>0,05]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что изменение внутриклеточного содержания монооксида углерода не оказывало влияния на экспрессию гена bcl-2 как при сохраненной активности p38 MAP киназы, так и при ее выключении (табл. 21).

При добавлении в интактную культуру T-лимфобластной лейкемии CORM-2 в концентрации 50 мкМ значения экспрессии гена bcl-x1 достоверно снижались - до 3,36(2,92-3,99) усл.ед. [9,92(9,76-13,33) усл.ед. – в контроле, p<0,05]. Инкубирование клеток линии Jurkat совместно с ингибитором p38

MAP киназы и CORM-2 в концентрации 50 мкМ приводило к статистически значимому снижению экспрессии гена *bcl-x1* до 6,95(5,88-6,96) усл.ед. ( $p < 0,05$ ). Однако по сравнению с культурой, инкубированной только с донором монооксида углерода, значения данного параметра были достоверно выше ( $p < 0,05$ ) (табл. 21). Полученные результаты позволяют заключить, что монооксид углерода является негативным регулятором экспрессии гена *bcl-x1*, при этом опосредует свое влияние через активацию p38 MAPK.

Наряду с этим, воздействие CORM-2 в концентрации 50 мкМ на клетки линии Jurkat приводило к достоверному снижению уровня мРНК гена *bad* [1,24(0,75-1,64) усл.ед. при 3,10(2,47-3,19) усл.ед. в интактной культуре,  $p < 0,05$ ]. Ингибирование p38 MAPK и воздействие CORM-2 в концентрации 50 мкМ не приводило к достоверным изменениям величины анализируемого параметра [1,81(1,72-2,49) усл.ед.] по сравнению с контролем ( $p > 0,05$ ), превышая при этом соответствующие значения при изолированном действии газа ( $p < 0,05$ ) (табл. 21). Таким образом, CORM-2-опосредованное подавление экспрессии гена *bad* является, по всей видимости, p38-зависимым.

Воздействие CORM-2 в концентрации 50 мкМ на интактную культуру и культуру с ингибированной p38 MAP киназой не приводило к достоверным изменениям уровня мРНК гена *baх* [0,76(0,41-1,17) и 0,48(0,45-0,85) усл.ед. соответственно] по сравнению с интактной культурой [0,91(0,85-1,35) усл.ед.,  $p > 0,05$ ]. При этом статистически значимые различия этого показателя в группах с активной и ингибированной p38 MAP киназой отсутствовали ( $p > 0,05$ ) (табл. 21). Экспрессия гена *baх* не изменялась при повышении внутриклеточной концентрации монооксида углерода. При этом изменения состояния p38 MAPK-зависимых путей на данном эффекте не отражаются.

Таким образом, монооксид углерода является p38-зависимым негативным регулятором экспрессии двух изученных нами генов – *bcl-x1* и *bad*. На экспрессию генов *bcl-2* и *baх* изменения внутриклеточной концентрации монооксида углерода влияния, по данным нашего исследования, не оказывают.

### 3.3.6. Особенности экспрессии мРНК и содержания соответствующих белков-ингибиторов каспаз при изменении внутриклеточной концентрации монооксида углерода и выключении р38 MAPK-зависимых механизмов

Нами методом ПЦР в «реальном времени» была проведена оценка экспрессии генов белков-ингибиторов каспаз (рис. 35).

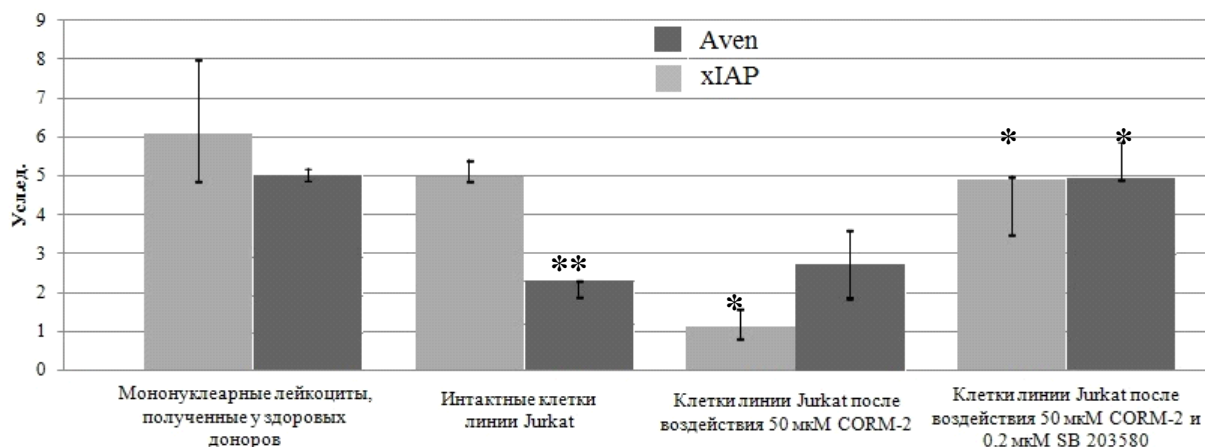


Рис. 35. Экспрессия генов xIAP и Aven при инкубации в условиях повышения внутриклеточной концентрации монооксида углерода, (Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)); \* - достоверность различий по сравнению с интактными клетками линии Jurkat, \*\* - достоверность различий по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров

Воздействие донора СО в концентрации 50 мкМ на клетки линии Jurkat достоверно снижало уровень мРНК гена xiap - до 1,14(0,82-1,58) усл.ед., по сравнению с интактной культурой [4,97(4,88-5,4) усл.ед., p<0,05], а предшествующее этому ингибирование р38 MAP киназы отменяло указанные изменения [4,89(3,48-4,98) усл.ед., p<0,05] (рис. 35). При этом воздействие CORM-2 в концентрации 50 мкМ вызывало статистически значимое уменьшение содержания белка xiap - до 9,25(5,53-12,98) усл.ед. по сравнению с интактной культурой.

Предшествующее ингибирование р38 MAPK вызывало достоверное увеличение содержания протеина [65,70(51,47-79,93) усл.ед.] как по сравнению с интактной культурой [15,57(14,29-16,84) усл.ед.] (p<0,05), так и по сравнению с клетками, подвергнутыми изолированному действию газа (p<0,05) (рис. 36).



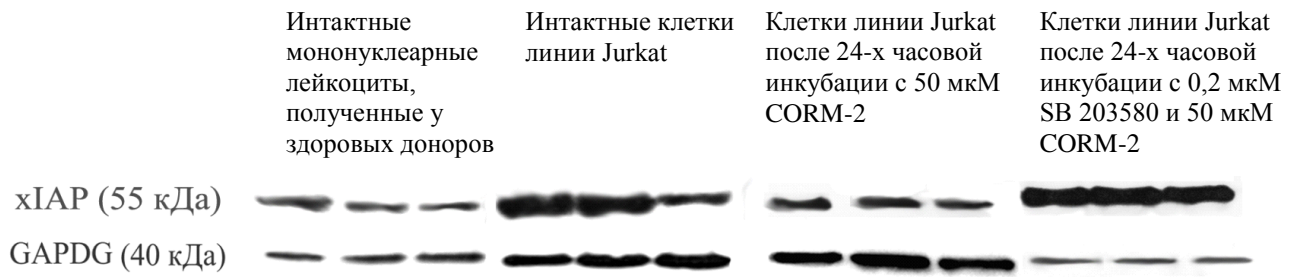


Рис. 36. Внутриклеточное содержание белка xIAP в условиях воздействия донора монооксида углерода

Следовательно, монооксид углерода является р38 MAPK-зависимым негативным регулятором экспрессии гена *xiap*, и действие его приводит к снижению содержания соответствующего белка.

Экспрессия гена *aven* не изменялась относительно интактной культуры при воздействии на клетки линии Jurkat CORM-2 в концентрации 50 мкМ [1,99(1,63-2,00) и 2,71(1,85-3,57) усл.ед., соответственно,  $p > 0,05$ ]. Однако при ингибировании р38 киназы и дальнейшем воздействии донора монооксида углерода уровень мРНК изучаемого гена достоверно возрастал [4,92(4,87-5,86) усл.ед.] по сравнению с интактной культурой [1,99(1,63-2,00) усл.ед.,  $p < 0,05$ ], превышая при этом значения, полученные при изолированном воздействии газа ( $p < 0,05$ ) (рис. 36).

При культивировании клеток линии Jurkat с CORM-2 в концентрации 50 мкМ, а также при добавлении в среду инкубации селективного ингибитора р38 MAP киназы достоверных изменений содержания белка Aven по сравнению с интактной культурой не отмечалось [1,28(1,25-1,31) и 2,26(1,97-2,55) усл.ед. соответственно,  $p > 0,05$ ] (рис. 37).

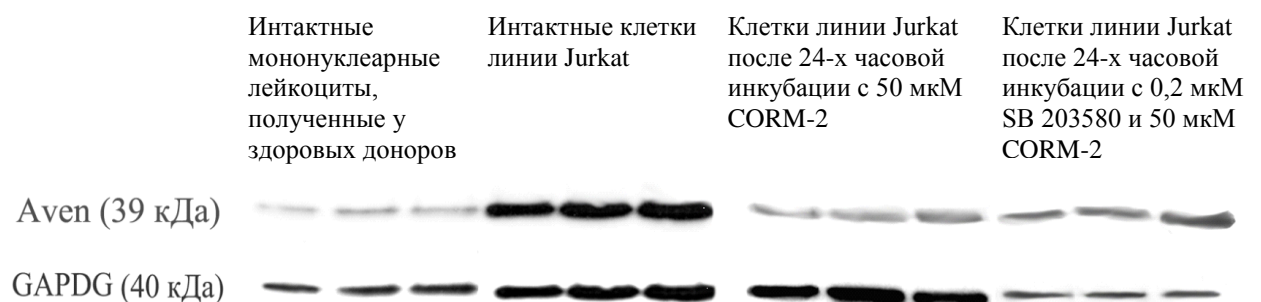


Рис. 37. Внутриклеточное содержание белка Aven в условиях воздействия донора монооксида углерода

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что повышение внутриклеточной концентрации монооксида углерода приводит к изменению экспрессии гена *aven* только на фоне блокированной p38 MAPK; на содержание соответствующего протеина монооксид углерода влияния не оказывал.

Таким образом, по итогам проведенного исследования, нами может быть высказано предположение, что мишенью действия монооксида углерода является только белок  $\chi$ IAP.

### 3.3.7. Оценка активности каспазы-3 и -9 при изменении внутриклеточной концентрации монооксида углерода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов

В рамках проведенного диссертационного исследования нами была определена активность каспаз-3 и -9 в условиях воздействия донора монооксида углерода в проапоптотической дозе (табл. 21).

Таблица 21

Активность каспаз-3 и -9 в клетках линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах в условиях воздействия донора монооксида углерода, (Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Условия инкубации клеток	Активность каспазы-3, усл.ед.	Активность каспазы-9, усл.ед.
Интактные мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров	0,72 (0,71-0,73)	1,40 (1,30-1,50)
Интактные клетки линии Jurkat	1,00 (0,99-1,01)	1,00 (0,99-1,01)
Клетки линии Jurkat после воздействия 50 мкМ CORM-2	1,26 (1,20-1,31) p<0,05	1,67 (1,61-1,70) p<0,05
Клетки линии Jurkat после воздействия 50 мкМ CORM-2 и 0,2 мкМ SB 203580	3,65 (3,59-3,70) p<0,05	3,25 (3,23-3,29) p<0,05

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с интактной культурой линии Jurkat

Воздействие CORM-2 в концентрации 50 мкМ на клетки линии Jurkat вызывало достоверное повышение активности каспазы-3 и -9, по сравнению с

контролем ( $p < 0,05$ ). Кроме того, активность каспазы-3 и -9 достоверно возросла при культивировании клеток линии Jurkat, которые предварительно подверглись ингибированию p38 MAPK совместно с действием донора монооксида углерода [3,65(3,59-3,70) и 3,25(3,23-3,29) усл.ед., соответственно] как по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ), так и по сравнению с изолированным действием газа ( $p < 0,05$ ) (табл. 21).

Таким образом, повышение внутриклеточной концентрации монооксида углерода приводит к повышению активности каспазы-3 и -9, при этом воздействие на фоне ингибированной p38 MAPK еще больше повышает активность указанных каспаз, демонстрируя тем самым антиапоптотические свойства.

### **3.3.8. Изменения количества клеток, экспрессирующих TNFR1, и уровня TNF $\alpha$ в супернатантах культур клеток при изменении внутриклеточной концентрации монооксида углерода и выключении p38 MAPK-зависимых механизмов**

На последнем этапе нами было оценено количество клеток, экспрессирующих на своей поверхности рецепторы к TNF $\alpha$ , а также уровень продукции соответствующего лиганда (табл. 22).

Воздействие CORM-2 в концентрации 50 мкМ на клетки линии Jurkat приводило к достоверному повышению количества клеток, экспрессирующих на своей поверхности TNFR1 [88,73(85,10-93,45)%,  $p < 0,05$ ], по сравнению с контролем [2,00(1,35-2,45)%]. Аналогичное воздействие на фоне ингибированной p38 MAPK приводило к увеличению числа этих клеток по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ), при этом оно оказалось ниже такового при изолированном действии газа ( $p < 0,05$ ) (табл. 22).

Содержание TNF $\alpha$  в среде клеток линии Jurkat в условиях повышения внутриклеточной концентрации монооксида углерода, как при активном, так и при ингибированном состоянии p38 MAPK от контрольных значений не

отличалось [10,50(10,10-10,90); 11,60(11,00-12,20) и 11,70(10,80-12,40) пг/мл, соответственно] ( $p > 0,05$ ) (табл. 22).

Таблица 22

Уровень TNF $\alpha$  в супернатантах культур и содержание TNFR1–экспрессирующих клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов в условиях воздействия донора монооксида углерода и селективного ингибитора p38 MAPK, (Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Условия инкубации	Количество TNFR1–положительных клеток, %	Уровень секреции TNF $\alpha$ , пг/мл
Мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров	2,01 (0,91–3,04)	885,40 (707,90-995,40)
Интактные клетки линии Jurkat	2,00 (1,35-2,45) $p_1 > 0,05$	11,70 (10,80-12,40) $p_1 < 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия mM CORM-2	88,73 (85,10-93,45) $p_2 < 0,05$	10,50 (10,10-10,90) $p_2 > 0,05$
Клетки линии Jurkat после воздействия mM CORM-2 и 5 мкМ SB 203580	73,06 (71,55-74,95) $p_2 < 0,05$	11,60 (11,00-12,20) $p_2 > 0,05$

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

Таким образом, увеличение внутриклеточной концентрации монооксида углерода приводит к повышению готовности клеток вступить в рецептор-опосредованный апоптоз, однако уровень продукции соответствующего лиганда не изменялся. p38 MAPK на указанные процессы влияния не оказывала.

## Глава 4. Обсуждение результатов исследования

Исследованиями последних лет была убедительно продемонстрирована высокая значимость внутриклеточных газовых транмиттеров для функционирования различных органов и систем. Первоначально считалось, что газы обладают только цитотоксическим эффектом и способствуют повреждению тканей. Но после того, как было показано, что данные вещества продуцируются эндогенно, их роль в молекулярной физиологии и патофизиологии была пересмотрена. В настоящее время известно, что эти «токсические» продукты необходимы для функционирования сердечно-сосудистой, нервной и иммунной систем, регуляции многих внутриклеточных путей сигнальной трансдукции, включая апоптоз – программированную клеточную гибель [Wang R., 2005].

### 4.1. Влияние внутриклеточных газовых транмиттеров на реализацию суицидальной программы клетки

Изучение роли какого-либо определенного молекулярного механизма требует создания экспериментальной модели, ключевой характеристикой которой является возможность анализа изолированной цепи событий, приводящих к патологическим изменениям [Каркищенко Н.Н., 2005]. Основываясь на этом положении, нами было предпринято комплексное экспериментальное исследование, направленное на установление молекулярных мишеней, ответственных за модуляцию апоптоза, опосредованную действием внутриклеточных газовых транмиттеров.

На первом этапе нашего исследования проводилась проверка гипотезы о влиянии внутриклеточных газовых транмиттеров 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 воздействии доноров оксида азота, сульфида

водорода и монооксида углерода в различной концентрации и продолжительности действия.

Известно, что для изменения внутриклеточной концентрации газовых трансмиттеров используются различные методологические подходы. В частности, увеличение внутриклеточного содержания газовых трансмиттеров может быть достигнуто при добавлении в культуру клеток веществ-предшественников (например, L-аргинина, L-цистеина и гема) либо доноров газов, а также путем активации внутриклеточной продукции соответствующими ферментами [Wang R., 2005]. К широко используемым агентам, вызывающим в клетках изменения концентрации газотрансмиттеров, относятся доноры газовых трансмиттеров - гидросульфид натрия (NaHS), нитропруссид натрия (SNP), 3-(аминопропил)-1-гидрокси-3-изопропил-1,2-оксо-1-триазин (NOC-5), и трикарбонил-дихлорорутений(II) димер (CORM-2). По данным литературы, применение указанных доноров является оптимальным для моделирования влияния газовых трансмиттеров на внутриклеточные процессы [Chen X., 2004; Zabalgoitia M., 2008; Hidaka A., 2010]. Данные вещества способны диссоциировать в растворе с высвобождением газообразных молекул, которые благодаря своим липофильным свойствам, легко проникают через клеточные мембраны, достигая своих внутриклеточных мишеней.

Таким образом, нами были сформированы три экспериментальные модели. Первая модель, основанная на применении двух доноров оксида азота – SNP и NOC-5, позволила выявить вклад последнего в молекулярные механизмы апоптоза клеток линии Jurkat и установить дозозависимые эффекты. Вторая и третья модели дали возможность воспроизвести клеточную реакцию на повышение внутриклеточной концентрации сульфида водорода и монооксида углерода, соответственно. Все три модели были дополнены применением селективного химического ингибитора p38 MAPK для выявления роли указанной киназы в изучаемых молекулярных механизмах.

Использованная в нашем исследовании клеточная линия Т-лимфобластной лейкемии имеет ряд особенностей, приобретенных естественно, а также созданных искусственно в целях иммортализации линии. Нами было показано, что количество клеток линии Jurkat, вступивших в апоптоз, достоверно меньше аналогичного показателя, оцененного в культуре мононуклеарных лейкоцитов, полученных из крови здоровых доноров (табл. 6). Известно, что одной из особенностей трансформированного фенотипа клеток линии Jurkat является гиперэкспрессия белка CREBBP. cAMP-зависимый элемент-связывающий белок (CREBBP) играет ключевую роль в эмбриогенезе, контроле роста и гомеостазе путем связывания хроматина, ответственного за распознавание транскрипционных факторов. Также известно, что фосфорилирование CREB в позиции Ser133 требуется для его транскрипционной активации [Perianayagam M.C. et al., 2006]. Реаранжировка гена CREBBP с хромосомной транслокацией была выявлена при острой миелоидной лейкемии [Perianayagam M.C. et al., 2006], гиперэкспрессия CREBBP была обнаружена в клетках линии Jurkat. Кроме того, показано, что усиление апоптотической гибели клеток происходит в присутствии миРНК CREB1, что приводит к угнетению транскрипции соответствующего гена [Caravatta L. et al., 2008]. Разумно предположить, что гиперэкспрессия гена CREBBP в клетках линии Jurkat приводит к подавлению апоптотической гибели клеток, что и было зафиксировано нами при помощи аннексинового теста.

Далее, руководствуясь основным замыслом настоящего исследования, выясняли реакцию клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, на повышение внутриклеточной концентрации газовых посредников. Нами было показано, что действие в течение 15 мин SNP в концентрации 100 мМ, NaHS - в концентрации 10 мМ, а также действие 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 (табл. 6, 8, 15, 20).

Указанные концентрации и продолжительность воздействия доноров газотрансмиттеров не вызывали статистически значимого повышения количества клеток линии Jurkat с некротическими изменениями, а также являлись интактными для мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров (табл. 5, 7, 14, 19).

Возможно, быстрота эффекта SNP *in vitro* вызвана способностью оксида азота в миллимолярных концентрациях приводить к образованию свободных радикалов и подавлять митохондриальное дыхание. По всей видимости, в качестве внутриклеточного мессенджера оксид азота действует в микромолярных концентрациях, воздействуя на специфические мишени и модулируя молекулярные пути внутри клетки. Доноры сульфида водорода и монооксида углерода запускают апоптоз клеток линии Jurkat, молекулярные мишени подобного действия и предстояло идентифицировать в нашем исследовании.

#### **4.2. Вовлеченность митохондриального и рецепторного путей в механизмы апоптогенного действия внутриклеточных газовых трансмиттеров**

Для выяснения молекулярных механизмов, лежащих в основе выявленного влияния газовых трансмиттеров на программированную клеточную гибель, нами была проведена оценка состояния митохондриального пути инициации апоптоза в интактных клетках линии Jurkat.

Наиболее информативным показателем состояния и функциональной активности митохондрий является митохондриальный трансмембранный потенциал. Данный параметр представляет собой электрохимический градиент протонов, создаваемый при переносе электронов на внутренней мембране митохондрий. Падение  $\Delta\psi$  может происходить за счет открытия неселективных пор пермеабилizационного перехода между наружной и внутренней мембранами митохондрий [Garrido C. et al., 2006].



Многочисленные исследования показали, что комплексы цитоплазматических и митохондриальных белков участвуют в формировании и функционировании поры. Проапоптотические белки семейства Bcl-2, такие как Bid, Bax и Bak могут участвовать в формировании этих пор; в этом процессе принимают участие также канал VDAC, транслоказа адениловых нуклеотидов, бензодиазепиновый рецептор и циклофилин D (Cyclo D) [Zoratti M. et al., 2005]. Существуют также свидетельства того, что выход апоптогенных факторов может происходить через предполагаемый митохондриальный апоптозиндуцирующий канал (MAC), а также через церамидный канал [Siskind L.J., 2005]. Образование этих пор во внутренней и наружной мембранах зависит от целого ряда биоэнергетических, транспортных и окислительно-восстановительных условий, которые, в конечном счете, могут привести к серьезным изменениям в структуре митохондриальных белков и липидов [Siskind L.J., 2005]. В культуре Т-лимфобластной лейкемии с использованием метода лазерной проточной цитофлуориметрии нами было зарегистрировано достоверное снижение трансмембранного митохондриального потенциала по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров (рис. 10).

Показано, что цитотоксическое действие газовых трансмиттеров опосредовано изменением проницаемости митохондриальных мембран. Полученные нами на культуре Т-лимфобластных лейкоцитов результаты свидетельствуют о том, что повышение внутриклеточной концентрации оксида азота приводит к повышению количества клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом как при действии SNP в концентрации 100 мМ, так и при действии NOC-5 в концентрации 100 мкМ, то есть эффект этот является специфическим и не может рассматриваться как дозозависимый (рис. 10). Ранее была продемонстрирована способность нитропрусида натрия (SNP) снижать активность комплекса IV электроно-транспортной цепи хондроцитов, вызывая тем самым апоптоз [Erusalimsky J.D., Moncada S., 2007]. Кроме того, окись азота, ингибируя активность

митохондриальных белков, вызывает деполяризацию внутренней митохондриальной мембраны, выход апоптозиндуцирующих факторов и дальнейшее развитие апоптоза [Garrido C. et al., 2006]. Возможно, описанный механизм и лежит в основе выявленного нами повышения количества клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом.

Обращало на себя внимание несоответствие количества клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом количеству клеток, имевших апоптотические признаки. Возможно, оксид азота, наряду с выраженным действием на митохондрии, способен запускать протекторные механизмы, не дающие реализоваться интенсивному выходу проапоптотических веществ из митохондрий в соответствующий уровень апоптоза.

Нами было показано, что повышение внутриклеточной концентрации сульфида водорода и монооксида углерода с использованием их доноров в концентрации 10 мМ и 50 мкМ (соответственно) приводит к увеличению количества клеток линии Jurkat со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом (рис. 22, 31). Однако фактические данные, накопленные к настоящему времени, свидетельствуют о том, что H<sub>2</sub>S защищает митохондрии от повреждений и активации проапоптотического сигнального каскада [Calvert J.W. et al., 2010], а монооксид углерода предотвращает пермеабиллизацию митохондриальной мембраны гепатоцитов [Queiroga C.S.F. et al., 2011]. Стоит отметить, что повышение внутриклеточной концентрации сульфида водорода приводит к повышению количества клеток со сниженным  $\Delta\psi$  в наименьшей степени (в 1,5 раза), по сравнению с другими газами, хотя использованная нами концентрация превышала физиологическую. Имеются данные, что H<sub>2</sub>S способен открывать K<sub>ATP</sub> каналы митохондрий, что приводит к серии внутриклеточных событий, включая ингибирование MAPK сигнального пути и сохранение 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.

Известно, что одной из причин возникновения пор в мембранах митохондрий является дисбаланс белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2 [Garcia-Saez A.J., 2010]. Указанное семейство является важнейшей контролирующей системой реализации митохондриального пути апоптоза. Необходимо отметить, что соотношение про- и антиапоптотических членов данного семейства протеинов является высокорегулируемым как на транскрипционном, так и на посттрансляционном уровне, а также посредством белок-белковых взаимодействий. Установлено, что опухолевые клетки используют множество механизмов депрессии апоптоза. Одним из них является повышение содержания антиапоптотических и уменьшение уровня проапоптотических протеинов. Дисбаланс в системе белков семейства Bcl-2 может также становиться причиной опухолевой трансформации клетки. Для проверки данной гипотезы нами был проведен сравнительный анализ содержания мРНК указанных генов и соответствующих протеинов в мононуклеарных лейкоцитах и клетках линии Jurkat. Одновременно с этим оценивалось влияние проапоптотических концентраций доноров внутриклеточных газовых трансммиттеров на систему белков семейства Bcl-2 в опухолеотрансформированных лейкоцитах.

Антиапоптотическая активность Bcl-2 основана на его способности непосредственно связывать цитохром *c* и вытеснять его из апоптосомы, предотвращая, тем самым, активацию каспаз. Кроме того, Bcl-2 ингибирует пороформирующую активность проапоптотического белка Bax. Показано, что важным регуляторным механизмом является фосфорилирование Bcl-2; данное событие усиливает функции белка за счет способности фосфорилированной формы препятствовать прогрессии клеточного цикла [Deng X., 2004]. Кроме того, имеются сведения, что промотерная область гена Bcl-2 содержит CREB-связывающий сайт в своей восходящей части [Perianayagam M.C. et al., 2006].

В проведенном нами исследовании был оценен уровень мРНК гена *bcl-2* в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров и в клетках линии Jurkat. Установлено, что значения данного показателя в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, были в 2 раза меньше соответствующих величин в клетках линии Jurkat (табл. 10). Полученные данные могут быть результатом гиперэкспрессии в клетках линии Jurkat белка CREB, участвующего в регуляции транскрипции антиапоптотического гена *Bcl-2* [Perianayagam M.C. et al., 2006].

Известно, что экспрессия генов регулируется как на транскрипционном, так и на трансляционном уровнях [Патрушев Л. И., 2000]. Поэтому для проверки гипотезы о роли повышения содержания мРНК гена в изменении уровня соответствующего белка нами был проведен вестерн-блот анализ. В результате было выявлено увеличение содержания белка *Bcl-2* в интактной культуре Т-лимфобластной лейкемии, по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров (рис. 11). Возможно, зафиксированные нами активация транскрипции гена антиапоптотического белка *Bcl-2* и, как следствие, повышение содержания соответствующего протеина являются механизмом подавления апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat.

Далее нами был изучен эффект проапоптотических доз доноров оксида азота (микро- и миллимолярной концентрации), сульфида водорода и монооксида углерода подобранных ранее на экспрессию гена *bcl-2* клетками линии Jurkat.

При этом было установлено, что после 15-ти минутной инкубации Т-лимфобластных лейкоцитов с SNP в концентрации 100 мМ отмечалось снижение уровня экспрессии гена *bcl-2* (табл. 10). Известно, что оксид азота способен напрямую регулировать активность некоторых ферментов и транскрипционных факторов через реакцию S-нитрозилирования – быстрой биохимической реакции, приводящей к нарушению функционирования белка [Hess D.T., Stamler J.S., 2011]. Учитывая время воздействия данного донора

можно предположить, что его эффект, выявленный в данном исследовании, связан именно с S-нитрозилированием. Показано, что посредством S-нитрозилирования регулируется активность многих тиолсодержащих ферментов и регуляторных протеинов, таких как CREB, AP-1 и NF-κB [Hess D.T., 2005]. Анализируя данные литературы и собственные результаты, можно предположить, что воздействие нитропруссид натрия в проапоптотической концентрации, равной 100 мМ, вызывает S-нитрозилирование транскрипционного фактора CREBBP, что приводит к снижению транскрипции гена bcl-2.

Однако 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 (рис. 11). Возможно, данный эффект вызван включающимся компенсаторным механизмом, посредством которого в ответ на угнетение транскрипции гена bcl-2 происходит замедление деградации соответствующего протеина. Ранее было показано, что S-нитрозилирование самого белка Bcl-2 предотвращает его деградацию через убиквитин-протеасомальный путь [Azad N. et al., 2006].

Уровень мРНК гена bcl-2 при воздействии NOC-5 в концентрации 100 мкМ на клетки линии Jurkat в течение 24 ч также достоверно снижался как по сравнению с таковыми в интактной культуре, так и по сравнению с соответствующими значениями в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров (табл. 10). Данный эффект высвобождающегося оксида азота может быть связан на наш взгляд с активацией системы ГЦ-цГМФ-ПК. К эффектам цГМФ может быть непосредственно отнесено фосфорилирование протеинкиназой G специфических факторов транскрипции, таких как CREB и TFII-I [Pilz R.V., Casteel D.E., 2003]. NOC-5-опосредованное угнетение транскрипции гена bcl-2 является более выраженным, возможно, как в силу времени воздействия (24 ч), так и в силу вовлеченности системы ГЦ-цГМФ-ПК. Снижение уровня транскрипта гена bcl-2 не сопровождалось достоверным изменением содержания

соответствующего продукта, определенного методом вестерн-блоттинга (рис. 12). Данный эффект NOC-5 может быть объяснен описанным выше свойством оксида азота стабилизировать белок Bcl-2, предотвращая его деградацию и, благодаря этому, поддерживать его уровень в клетке, даже в условиях подавления транскрипции гена.

При 15-ти минутной инкубации Т-лимфобластных лейкоцитов с NaHS в концентрации 10 мМ отмечалось снижение уровня мРНК гена bcl-2 относительно таковых в интактной культуре (табл. 16). Известно, что H<sub>2</sub>S в физиологических концентрациях способен активировать PKC как *in vitro*, так и *in vivo*. Исходом активации данного пути в кардиомиоцитах является фосфорилирование белка Bad, повышение экспрессии Bcl-2 и Bcl-xL, а также белков теплового шока (HSP) [Calvert J.W. et al., 2009]. Однако в культуре человеческих фибробластов H<sub>2</sub>S-индуцированный апоптоз сопровождался повышением экспрессии p53, ku 70 и ku 80, Вах, цитохрома с, 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. В отличие от оксида азота и сульфида водорода, повышение внутриклеточной концентрации монооксида углерода не вызывало изменений экспрессии гена bcl-2 (табл. 21). Данный факт позволяет предполагать, что последний не является мишенью действия монооксида углерода.

Известно, что синтезированная мРНК может подвергаться процессам посттранскрипционной модификации и не всегда отражать истинное соотношение белков в клетке. Для того, чтобы выяснить внутриклеточное содержание изучаемых белков, нами был проведен вестерн-блот анализ, который показал, что уровень белка Bcl-2 в клетках линии Jurkat после воздействия на них NaHS увеличивается, а CORM-2 – снижается. Следовательно, зафиксированное нами угнетение экспрессии гена bcl-2 посредством сульфида водорода сопровождается повышением содержания

соответствующего белка, что в дальнейшем реализуется во вступлении клетки в апоптоз. Полученные нами результаты могут быть объяснены имеющимися данными о том, что сульфид водорода способен S-сульфгидрировать белки [Mustafa A.K., 2009], что, возможно, защищает их от деградации. Поскольку каких-либо протекторных свойств, подобных оксиду азота, для монооксида углерода не выявлено, его эффект может быть объяснен деградацией антиапоптотического белка Bcl-2 либо нарушением процессов трансляции.

Имеются данные, что другой антиапоптотический белок Bcl-X<sub>L</sub> способен блокировать образование апоптосомы, связываясь с Araf-1 и каспазой-9, образуя тройной комплекс [Bertini I., 2011]. Изучение экспрессии мРНК антиапоптотического гена bcl-xl в клетках линии Jurkat методом PCR-RT показало, что значения данного показателя превышали аналогичный параметр, оцененный в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров; при этом содержание белка Bcl-X<sub>L</sub> в изучаемых клетках статистически значимо не различалось. По всей видимости, в опухолевых клетках существуют посттранскрипционные механизмы, приводящие к частичной деградации мРНК гена bcl-xl. 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 (табл. 10, 16, 21).

Подобное действие оксида азота может быть связано со способностью вмешиваться в ДНК-связывающую активность большого количества цинксодержащих транскрипционных факторов через S-нитрозилирование цистеин-тиоловых групп с последующим образованием S-нитротиолов. S-нитрозилирование может регулировать множество ферментов и транскрипционных факторов CREB, AP-1 и NF-κB. Гены-мишени последнего включают несколько антиапоптотических белков, в том числе и Bcl-xL. К тому же, NF-κB может регулироваться оксидом азота или родственными молекулами посредством торможения активации. Изначально полагали, что

NO стабилизирует I $\kappa$ B $\alpha$  - ингибитор NF- $\kappa$ B, предотвращая деградацию последнего. Оксид азота также снижает экспрессию гена I $\kappa$ B $\alpha$ , но не p65 или p50 (субъединицы NF- $\kappa$ B), что говорит о специфической регуляции I $\kappa$ B $\alpha$  посредством NO. Известно также, что оксид азота способен прямо ингибировать NF- $\kappa$ B через S-нитрозилирование p50 субъединицы. Такая модификация NF- $\kappa$ B приводит к потере способности связываться со специфическими ДНК сайтами [Olson S.Y., Garban H.J., 2008]. Кроме того, известно, что антиапоптотический белок Bcl-xL является продуктом альтернативного сплайсинга гена bcl-x, наравне с проапоптотическим белком Bcl-xS. Оксид азота способен ингибировать транскрипционную активность проксимального региона промотора гена bcl-x, что приводит к экспрессии антиапоптотической изоформы bcl-xl. Кроме того, данный регион промотора содержит два GATA-связывающих сайта участвующих в регуляции транскрипции гена. Полученные результаты могут быть объяснены имеющимися в литературе данными о способности оксида азота снижать экспрессию GATA-4, что приводит к снижению экспрессии bcl-xl [Suzuki Y.J. et al., 2007]. Известно, что, помимо оксида азота, на активность NF- $\kappa$ B оказывает влияние и H<sub>2</sub>S. Механизмом положительной регуляции является индукция деградации I $\kappa$ B $\alpha$ , сопровождаемая активацией p65 субъединицы NF- $\kappa$ B. В то же время негативная регуляция активности NF- $\kappa$ B посредством H<sub>2</sub>S приводит к подавлению экспрессии ряда антиапоптотических генов, в частности bcl-XL [Rocha S. et al., 2005], что и было зарегистрировано в нашем исследовании. Полученные нами данные при изучении действия монооксида углерода могут быть объяснены его способностью влиять на активность некоторых транскрипционных факторов и киназ, что было продемонстрировано для NF- $\kappa$ B и p38 киназы [Brouard et al., 2002]. Показано, что другой транскрипционный фактор REV-ERB $\beta$  индуцирует экспрессию NF- $\kappa$ B, ИЛ-6, и циклооксигеназы-2 (COX-2), а также обладает способностью подавлять экспрессию I $\kappa$ B $\alpha$ . Связывание монооксида углерода с REV-ERB $\beta$



меняет свойства последнего на противоположные [Pardee K.I., 2009], что объясняет полученные нами результаты.

Оценка содержания белка Bcl-xL в клетках линии Jurkat методом вестерн-блоттинга показала, что воздействие оксида азота в обеих концентрациях и сульфида водорода не влияло на его уровень (рис. 13). Таким образом, угнетение экспрессии гена bcl-x1 не приводило к снижению содержания соответствующего протеина. Возможно, это вызвано высвобождением Bcl-xL из связи с другими протеинами, либо переходом в активную форму, а также защитой от деградации по аналогии с белком Bcl-2. Монооксид углерода снижал содержание белка в клетках линии Jurkat, что является следствием подавления экспрессии соответствующего гена, продемонстрированного нами ранее.

Важным участником в регуляции митохондриального пути апоптоза является белок Bad. Известно, что указанный протеин способен гетеродимеризоваться с Bcl-x1 или Bcl-2, нейтрализуя их протективный эффект и промотируя смерть клетки [Borner C., 2003]. Оценка уровня экспрессии гена bad показала, что величина его в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, была снижена по сравнению с интактными клетками культуры Т-лимфобластного лейкоза (табл. 10). Однако, оценка содержания протеина Bad методом вестерн-блота в клетках линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах, полученных из крови здоровых доноров, не выявила статистически значимых различий (рис. 16). По всей видимости, высокая экспрессия проапоптотического гена bad в опухолевых клетках является механизмом сопротивления опухолевой трансформации, однако, вырванная экспрессия не реализуется в соответствующий уровень белка и опухолевая клетка не гибнет за счет апоптоза.

Нами было показано, что высокая концентрация оксида азота и сульфид водорода не являются регуляторами экспрессии гена bad в клетках линии Jurkat. NO в низкой концентрации оказывался позитивным регулятором экспрессии гена bad, а монооксид углерода – негативным (табл.

10, 16, 21). Действие оксида азота в низкой концентрации, возможно, опосредовано S-нитрозилированием транскрипционных факторов, а эффект монооксида углерода – их SUMOилированием [Haschemi A. et al., 2011].

Оценка внутриклеточного содержания белка Bad показала, что воздействие оксида азота в микромолярной концентрации, сульфида водорода и монооксида углерода повышало содержание белка Bad в клетках линии Jurkat. Воздействие миллимолярной дозы оксида азота на изучаемый параметр не влияло (рис. 15, 16, 25, 34).

Следовательно, оксид азота влияет на содержание белка Bad дозозависимо. Действуя в микромолярной концентрации, NO вызывает повышение содержания белка Bad вследствие повышенной экспрессии соответствующего гена. Эффект сульфида водорода и монооксида углерода на содержание белка Bad не опосредуются регуляцией экспрессии. Имеются данные, что NaHS и NO влияют на белок mTORC1, который участвует в связывании фактора eIF4A, а, следовательно, регулирует инициаторную фазу и фазу элонгации трансляции [Lee H.J. et al., 2011]. Кроме того, показано, что белок mTORC1 стабилизирует mRNA генов PUMA и BAD [Lam D. et al., 2012]. Возможно, сульфид водорода посредством регуляции mTORC1 стимулирует стабилизацию и трансляцию мРНК гена Bad. Повышение уровня белка Bad на фоне снижения экспрессии соответствующего гена при действии на клетки CORM-2 позволяет предполагать наличие аналогичного механизма действия для CO.

Известно, что в нормальных (не стрессовых) условиях после синтеза другой проапоптотический белок Bax подвергается убиквитилированию, которое негативно регулирует проапоптотическую функцию, отправляя его на протеасомную деградацию. Показано, что в цитозоле белок Bax ассоциирован с множеством белков, включая Bcl-2, 14-3-3, humanin и Ku70. Ассоциация с Ku70 вызывает деубиквитилирование Bax, указанный процесс усиливается при действии проапоптотических стимулов. При действии тех же стимулов Ku70 подвергается ацетилюрованию посредством фермента

ацетилтрансферазы СВР или РСАФ и высвобождает Вах. Свободный цитозольный неубиквитилированный белок Вах транслоцируется в митохондрию, где вызывает высвобождение апоптогенных факторов. Посттранскрипционная регуляция гена *вах* заключается в стабилизации мРНК и защиты от деградации [Borner C., 2003]. Кроме того, для указанного гена обнаружено множество транскрипционных вариантов – продуктов альтернативного сплайсинга. Таким образом, оценка белка Вах в цельноклеточных лизатах не позволит судить о его функциональной активности, в то время как реакция клетки в форме изменения активности транскрипции данного гена показывает эффект внутриклеточных газовых транмиттеров.

В результате проведенной нами оценки экспрессии гена *вах* методом ПЦР в «реальном времени» было показано, что в клетках линии Jurkat указанный ген гиперэкспрессирован (табл. 10). Известно, что экспрессия гена Вах регулируется опухолевым супрессором Р53. Отличительной особенностью клеточной линии Jurkat является отсутствие дикого типа белка р53; возможно именно данный факт приводит к гиперэкспрессии гена *вах* [Karpinich N.O., 2005].

О влиянии газовых транмиттеров на экспрессию гена *вах* на сегодняшний день накоплено небольшое количество противоречивых сведений. Нами была продемонстрирована NO-опосредованная сверхэкспрессия гена *вах*. Кроме того, нами было показано, что донор сульфида водорода являлся негативным регулятором экспрессии гена *вах*. Экспрессия гена *вах* не изменялась при повышении внутриклеточной концентрации монооксида углерода (табл. 21).

Известно, что в условиях модуляции внутриклеточной газовой коммуникации запускается еще один путь инициации программированной клеточной гибели, который обуславливает элиминацию клеток, презентирующих определенные рецепторы на своей мембране. Рецепторы способны воспринимать внеклеточные сигналы к апоптозу, передавая их

внутри клетки с помощью внутриклеточных адаптерных молекул, преобразующих сигнал к апоптозу [Garg A.K., Aggarwal B.B., 2002]. Классическими специфическими рецепторами, индуцирующими апоптоз, является суперсемейство TNF-рецепторов [Ярилин А.А., 2001]. 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. 13).

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 100 мкМ NOC-5 не вызывало достоверных изменений изучаемого параметра по сравнению с контролем (табл. 13). Следовательно, эффект оксид азота на презентацию опухолевыми клетками TNFR1 является дозозависимым. Сульфид водорода на экспрессию клетками линии Jurkat рецепторов к TNF $\alpha$  не влиял, а воздействие монооксида углерода приводило к повышению величины этого показателя (рис. 30, табл. 23).

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 $\alpha$ , запускающего внутриклеточный каскад, приводящий к активации каспаз.

В проведенных нами исследованиях анализ уровня продукции TNF- $\alpha$  показал, что величина этого показателя *in vitro* снижалась при действии оксида азота в высокой концентрации и сульфида водорода. Действие оксида азота в низкой концентрации и монооксида углерода на продукцию TNF- $\alpha$  влияния не оказывало (табл. 13, 23).

Таким образом, нами было показано, что проапоптотическое действие NO, H<sub>2</sub>S и CO сопряжено с пермеабиллизацией митохондриальных мембран клеток, изменением экспрессии генов семейства Bcl-2 (рис. 38) и содержания соответствующих белков (рис. 39).

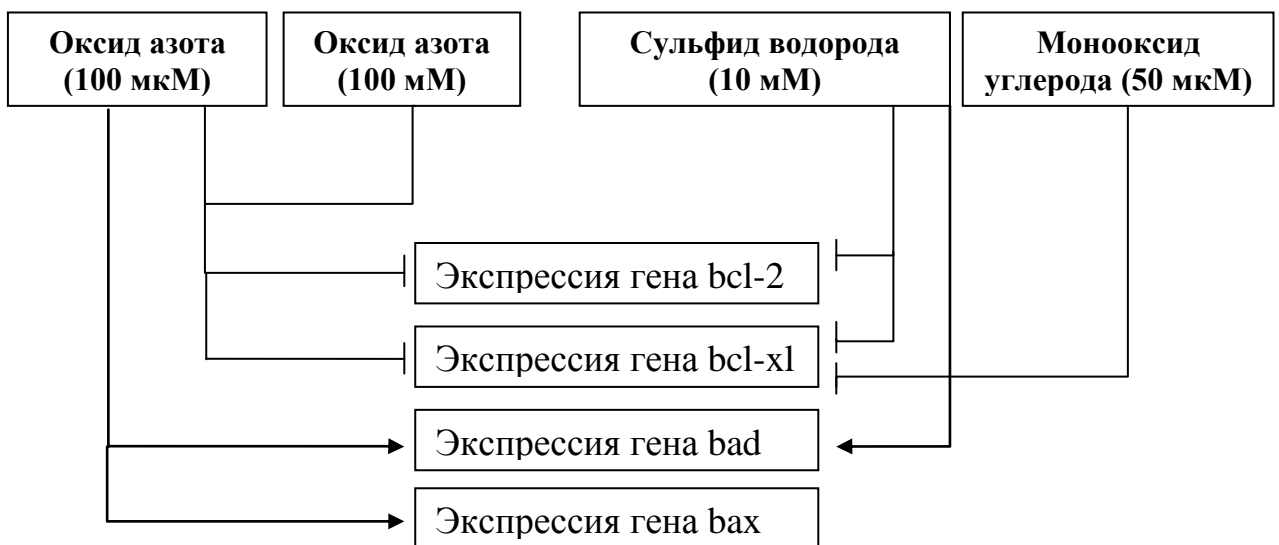


Рис. 38. Влияние внутриклеточных газовых трансммиттеров на уровень экспрессии генов семейства Bcl-2. Примечание, здесь и в рис. 39: → - активация, —| - ингибирование.

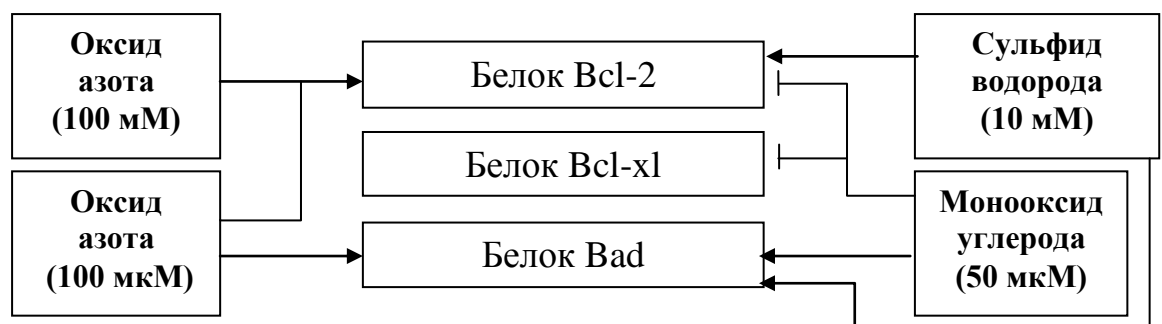


Рис. 39. Влияние внутриклеточных газовых трансммиттеров на содержание белков семейства Bcl-2

Кроме того, внутриклеточные газовые трансмиттеры модулируют и рецепторный путь апоптоза. Нами было показано, что действие SNP в миллимолярной дозе и CORM-2 повышает готовность опухолевых клеток крови вступить в рецептор-опосредованный апоптоз, однако продукция соответствующего лиганда снижается и апоптоз остается нереализованным. Действие NOC-5 в микромолярной концентрации и NaHS достоверных изменений в системе лиганд-рецептор не вызывала.

#### **4.3. Влияние внутриклеточных газовых трансмиттеров на экспрессию белков-ингибиторов каспаз и активность каспаз-9 и -3**

В общем сигнальном пути, приводящем к развитию апоптоза, выделяют две контрольные точки, в которых возможен выбор между реализацией запрограммированной гибели и выживанием клетки. Этот выбор осуществляется с участием ряда родственных молекул. На первом этапе в качестве таких регуляторов выступают белки семейства Bcl-2. Второй контрольной точкой в определении судьбы клетки является действие белков, подавляющих дистальные участки апоптоза. Известны белки, ингибирующие каспазу-8 (FLICE-протеазу), семейство белков IAP (апоптоз-ингибирующие белки), а также открытый сравнительно недавно белок Aven [Eibmann M., 2013].

Нами было проведено сравнение уровня экспрессии генов xIAP и Aven и содержания соответствующих белков в мононуклеарных лейкоцитах полученных у здоровых доноров, и в клетках линии Jurkat. Содержание белка xIAP в бласттрансформированных лимфоцитах оказалось в 2 раза выше его уровня в нормальных лимфоцитах (рис. 17). Известно что, xIAP ингибирует каспазы-3 и -9, что объясняет сниженный (несостоятельный) апоптоз в опухолевых клетках, что и было зафиксировано нами с помощью аннексинового теста (табл. 6). При этом анализ экспрессии гена xIAP не показал достоверных различий содержания мРНК в клетках линии Jurkat по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых

доноров (табл. 11). Возможно, высокий уровень белка xIAP в опухолевых клетках обусловлен не повышенной экспрессией мРНК соответствующего гена, а наличием в RING домене белка мутации. Известно, что RING домен ответственен за присоединение к xIAP убиквитина, приводящего к разрушению белка. Таким образом, наличие мутации приводит к неспособности xIAP к самодеградации, ингибированию каспаз-3 и -9 и несостоятельности апоптоза [Galban S., 2010].

На следующем этапе исследования нами была предпринята попытка оценить влияние внутриклеточных газовых транмиттеров на экспрессию генов-ингибиторов каспаз и содержание соответствующих белков в опухолевых клетках.

Добавление донора оксида азота (SNP и NOC-5) к клеткам линии Jurkat приводило к статистически значимому снижению уровня мРНК гена xIAP (табл. 11), однако, содержание белка было достоверно выше, чем в интактной культуре (рис. 17, 18). Как известно, экспрессия xIAP регулируется, в первую очередь, на уровне синтеза белка. M. Holcik [2003] было показано, что xIAP транслируется по кэп-независимому механизму инициации трансляции, опосредованному уникальной последовательностью (IRES), расположенной в его 5'-нетранслируемой области. Это позволяет мРНК xIAP активно транслироваться в условиях клеточного стресса, когда синтез большинства клеточных белков подавляется.

Позднее D. Durie и M. Holcik [2011] было обнаружено, что белок HuR способен связываться с 3'-нетранслируемой областью гена xIAP, тем самым стабилизируя мРНК и приводя к увеличению уровня xIAP в клетке. Известно, что оксид азота способен повышать содержание белка HuR в клетке [Kuwano Y., 2009]. Таким образом, снижение экспрессии гена xIAP сопровождается стабилизацией мРНК, что приводит к высокому уровню белка в клетке при действии NO.

Одним из механизмов усиления реализации программированной гибели клеток является снижение антиапоптотического белка xIAP. Однако

полученные нами результаты показывают, что при воздействии проапоптотической дозы донора оксида азота (SNP и NOC-5) содержание указанного белка повышалось (рис. 17, 18). Известно, что оксид азота способен напрямую реагировать с xIAP, приводя к S-нитрозилированию домена RING (образуя SNO-xIAP), что ингибирует E3 лигазную активность, тем самым ослабляя антиапоптотический эффект xIAP [Nakamura T., 2010].

Кроме того, имеются данные, доказывающие проапоптотический эффект xIAP. Так, показано, что в ответ на апоптогенный сигнал, часть белка xIAP быстро переходит из цитозоля в митохондрии (~15 мин). В данной локализации белок xIAP, поглощенный из цитозоля, может приводить к апоптозу, в сочетании с другими регуляторными белками, например, Вах. Показано, что xIAP опосредует олигомеризацию белка Вах в митохондриях, приводя к инициации высвобождения цитохрома с и активации каспаз. Кроме того, после перехода xIAP в митохондрию, такие апоптогенные факторы как Smac транслоцируются в цитозоль, что приводит к инактивации и деградации оставшейся в цитозоле фракции xIAP [Owens T.W. et al., 2010].

Идентичные эффекты по изменению экспрессии гена xIAP были обнаружены при культивировании клеток линии Jurkat с донором сульфида водорода (табл. 17). Однако содержание белка при действии данного газового трансмиттера менялось по-другому. При действии NaHS в концентрации 10 мМ экспрессия гена xIAP снижалась, содержание белка xIAP при этом не изменялось (рис. 27). По всей видимости, сульфид водорода обладает менее выраженным стабилизирующим действием на мРНК xIAP, по сравнению с NO.

Культивирование клеток линии Jurkat в среде, содержащей проапоптотическую дозу донора монооксида углерода, приводило к снижению экспрессии гена xIAP в 5 раз относительно интактной культуры (рис. 35), содержание исследуемого белка при этом снижалось в 1,5 раза (рис. 36). 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 и снижение уровня соответствующего протеина, что, в свою очередь, приводит к повышению активности каспазы-3. Как указывалось ранее, белок xIAP, наряду с антиапоптотическими, обладает и проапоптотическими свойствами. В связи с этим, возможно предположить, что монооксид углерода опосредует свое суицидальное влияние на клетки именно через повышение содержания белка xIAP.

Оценка уровня белка-ингибитора каспаз Aven показала, что в клетках линии Jurkat данного протеина содержится в 37 раз больше чем в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров (рис. 19). Однако уровень мРНК гена Aven был достоверно снижен в клетках линии Jurkat, по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами (табл. 11).

Возможно, в клетках линии Jurkat имеются механизмы, позволяющие стабилизировать белок Aven, защищая его от деградации и накапливая в клетке, что вполне может являться одним из механизмов устойчивости данных опухолевых клеток к апоптозу. Нами было показано, что действие SNP сопровождается снижением транскрипции гена *aven* (табл. 11), не оказывая влияние на трансляцию (рис. 19). Оксид азота, высвобождающийся при действии другого донора – NOC-5 – участвует в регуляции содержания белка Aven, повышая его уровень (рис. 21), при этом не оказывая влияния на экспрессию соответствующего гена (табл. 11). Возможно, оксид азота в высокой концентрации приводит к S-нитрозилированию транскрипционных факторов, нарушая экспрессию гена, что оксид азота в низкой концентрации вызывать не способен. Однако оксид азота в низкой концентрации, по всей видимости, способен участвовать либо в регуляции трансляции, стабилизируя мРНК, либо в посттрансляционной регуляции, стабилизируя сам протеин.

Воздействие сульфида водорода подавляло экспрессию гена Aven (табл. 17), однако изменения содержания соответствующего белка не происходило (рис. 28). 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, такие как 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 приводило к изменению экспрессии гена *Aven* (рис. 34), на содержание соответствующего протеина монооксид углерода также не влиял (рис. 36). 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 белки-ингибиторы каспаз *xIAP* и *Aven*, нами была проведена спектрофотометрическая оценка активности самих каспаз, в частности, каспазы-3 и каспазы-9.

Каспазы представляют собой семейство цистеиновых протеаз, содержащих 14 изоформ, которые играют ключевую роль в каскаде апоптотических событий. После воздействия проапоптотического сигнала зимогенные формы каспаз, которые постоянно присутствуют в клетке, подвергаются протеолитическому расщеплению и активации. Инициаторные каспазы (такие как каспаза-8, -9, и -10) могут расщеплять другие каспазы, в то время как суицидальные каспазы (включающие каспазу-3, -6, и -7) активируют ферменты, ответственные за деградацию клетки [McIlwain D.R., 2013]. Зафиксированное нами повышение активности каспазы-3 является 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 [McIlwain D.R., 2013].

Нами было показано, что проницаемость митохондриальных мембран увеличивается в 68 раз при действии SNP в концентрации 100 мМ, в 73 раза –

при действии NOC-5 в концентрации 100 мкМ, в 15 раз – при действии донора монооксида углерода в дозе 50 мкМ и в 8 раз – при повышении внутриклеточной концентрации сульфида водорода (10 мМ) (рис. 10, 22, 31). При этом SNP, NaHS и CORM-2 повышали активность каспазы-9 в одинаковой степени, NOC-5 не влиял на активность данного фермента (табл. 12, 18, 22). Установленное нами многократное повышение проницаемости митохондриальной мембраны в случае воздействия NO, а, как следствие, выход апоптоз-индуцирующих факторов, должны приводить к более выраженной активации каспазы-9 и -3, чего выявлено не было. Возможно, отсутствие адекватного эффекта NO-опосредованного выхода апоптоз-индуцирующих факторов из митохондрий на активность каспазы-3 и -9 вызвано ингибированием каспаз белком xIAP, содержание которого повышается при действии доноров оксида азота.

Известно, что все каспазы содержат одиночный цистеиновый остаток, являющийся каталитическим сайтом. Указанный аминокислотный остаток является восприимчивым к окислительно-восстановительной модификации и может подвергаться S-нитрозилированию в присутствии оксида азота. Было показано, что семь каспаз способны к обратимому ингибированию посредством NO через данную модификацию [Kim Y. M., 2000]. Указанное действие оксида азота может также вносить вклад в несоответственно низкую активность каспаз-3 и -9 при мощном NO-опосредованном нарушении целостности митохондриальных мембран. Нами было показано, что H<sub>2</sub>S 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  $\Delta\psi$  в случае действия CO в 2 раза превышало таковое при воздействии на клетки H<sub>2</sub>S (табл. 24, 32). 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.

Таким образом, все газы (NO, CO, H<sub>2</sub>S) подавляют экспрессию гена *xIAP*. Однако, только при действии монооксида углерода это угнетение экспрессии гена приводит к снижению содержания указанного протеина; действие оксида азота (независимо от дозы), в клетках линии Jurkat приводит к повышению содержания *xIAP*, в то время как действие сульфида водорода изменений указанного параметра не вызывает. Кроме того, белок *Aven* не является мишенью действия монооксида углерода. Действие оксида азота (100мкМ) повышает содержание белка *Aven*, не изменяя уровня экспрессии его гена, а в концентрации 100 мМ - угнетает его транскрипцию аналогично сульфиду водорода. Все указанные изменения баланса белков-ингибиторов каспаз все же оказываются не достаточными – все три газотрансмиттера повышают активность каспазы-3 и -9.

#### **4.4. Роль p38 MAPK в молекулярных механизмах апоптогенного действия внутриклеточных газовых трансммиттеров**

На следующем этапе исследования 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. В то же время накопленные к настоящему времени фактические данные свидетельствуют, что киназы, в частности p38, входящие в семейство MAPK (митоген-активированные протеинкиназы), участвуют в большинстве путей передачи сигнала [Cargnello M., Roux P.P., 2011].

Пиридинил-имидазольные препараты, к числу которых относится используемый нами ингибитор SB203580, были первыми идентифицированными ингибиторами p38 MAPK, способными конкурентно связываться с АТФ-связывающим доменом киназы. В низких концентрациях

данные соединения ингибируют p38 $\alpha$  и p38 $\beta$ , но не p38 $\gamma$  и p38 $\delta$  [Cuadrado A., Nebreda A.R., 2010]. В проведенном нами исследовании впервые была показана вовлеченность p38 MAP киназы в трансдукцию проапоптотического сигнала внутриклеточных газовых трансмиттеров. Так, было 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 (рис. 10, 22, 30). 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 et al., 2007]. Возможно, 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 действии CORM-2 мы наблюдали увеличение числа апоптотических клеток линии Jurkat, по сравнению с количеством их в культуре, инкубированной только с CORM-2, что доказывает антиапоптотические свойства p38 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 p38 MAP киназы не зависел (рис. 10, 22, 31).

Нами было показано, что оксид азота в высокой концентрации (100мМ) являлся негативным p38-зависимым регулятором экспрессии генов bcl-2, bcl-x1, xIAP, Aven, а также позитивным p38-зависимым регулятором

экспрессии гена *bax*. При этом сама p38 киназа являлась позитивным регулятором экспрессии гена *bad* (табл. 8, 9, 14, 15, 19, рис. 34). Полученные нами 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 p38 MAPK-зависимыми.

Кроме того, оксид азота в высокой концентрации оказался позитивным p38-зависимым регулятором содержания белков Bcl-2 и  $\chi$ IAP, но не являлся регулятором содержания Aven; при этом сама p38 киназа являлась негативным регулятором содержания белка bcl-x1 и bad (рис. 11-20, 23-28, 32-34, 36, 37). Известно, что эффект NO на стабильность белка Bcl-2 проявляется только при дефосфорилированном состоянии последнего [Azad N. et al., 2006]. Ингибирование p38 MAPK приводит к изменению статуса фосфорилирования Bcl-2 и снижению стабилизирующего эффекта оксида азота на белок. Данные результаты демонстрируют вовлеченность p38 MAPK в трансдукцию сигнала от оксида азота к Bcl-2. S. Wang [2008] в эксперименте с клеточной линией THP-1 показал, что действие NO способно стабилизировать мРНК большого числа генов через механизмы, которые частично зависят от активации MAPK p38. Возможно, именно с этим связано повышение содержания белка  $\chi$ IAP на фоне угнетения транскрипции соответствующего гена (рис. 17).

Микромолярная концентрация донора оксида азота затрагивала иные сигнальные пути, отличные от p38 MAPK. Доказательством этого служат полученные нами данные о том, что NOC-5 являлся негативным p38-независимым регулятором экспрессии генов bcl-2 и bcl-x1, а также позитивным p38-независимым регулятором экспрессии генов bad и bax. Однако p38-независимым являлось только NOC-5-опосредованное повышение содержания белка Bad - содержание белков Bcl-2, Aven и  $\chi$ IAP сопровождается вовлечением p38 MAPK (рис. 11-20, 23-28, 32-34, 36, 37).

Вероятно, оксид азота влияет на транскрипцию и трансляцию через разные сигнальные пути.

Сульфид водорода являлся негативным р38-зависимым регулятором экспрессии генов *bax*, *bcl-x1* и *Aven*, а также негативным р38-независимым регулятором экспрессии генов *bcl-2* и *xIAP*. Кроме того, нами было показано, что р38 киназа являлась позитивным регулятором экспрессии гена *bad* (табл. 10, 11, 16, 17, 21, рис. 35). Интересно отметить, что сигнальные пути и эффекты сульфида водорода на экспрессию генов и содержание соответствующих белков в некоторых случаях отличались. Так, сульфид водорода оказался позитивным р38-зависимым регулятором содержания белков *Bcl-2* и *Bad*, но не являлся регулятором содержания *Bcl-x1*, при этом сама р38 киназа выступала в роли негативного регулятора содержания белка *Aven* и позитивного регулятора содержания белка *xIAP* (рис.11-20, 23-28, 32-34, 36, 37).

Монооксид углерода являлся негативным р38-зависимым регулятором экспрессии генов *bcl-2*, *bad*, *bcl-x1* и *xiap* и не являлся регулятором экспрессии *bax*. Следовательно, монооксид углерода опосредует свое влияние на экспрессию генов через активацию р38. Кроме того, нами было показано, что р38 киназа может рассматриваться как негативный регулятор экспрессии гена *aven* (табл. 10, 11, 16, 17, 21, рис. 35). Следствием подавления экспрессии генов может являться снижение содержания соответствующих белков в клетке, что и было зарегистрировано нами. Монооксид углерода являлся негативным р38-зависимым регулятором содержания белков *Aven*, *xIAP*, *Bcl-2* и *Bcl-x1*, позитивным р38-зависимым регулятором содержания белка *Bad*. Помимо этого, нами было показано, что сама р38 киназа являлась негативным регулятором содержания белка *Bad* (рис.10-19, 22-27, 31-33, 35, 36).

Оценка вовлеченности р38 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 зависело. Воздействие на клетки линии Jurkat NOC-5 не отражается на количестве TNFR1-презентирующих клеток. Действие сульфида водорода на экспрессию клетками линии Jurkat рецепторов к TNF $\alpha$  влияния также не оказывало, однако, действие его на фоне блокированной p38 MAPK приводило к резкому увеличению количества клеток, несущих данный рецептор, до 90%, что позволяет предполагать наличие антиапоптотических свойств у указанной киназы. Действие донора монооксида углерода приводило к повышению значений параметра, при этом его эффект лишь частично являлся p38 MAPK-зависимым. Продукция TNF $\alpha$  клетками линии Jurkat на фоне изменения внутриклеточной концентрации газовых транмиттеров от статуса p38 MAPK не зависела (табл. 13, рис. 30, табл. 23).

Интересные данные были получены при изучении вовлеченности p38 MAPK в процессы изменения 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 действии сульфида водорода на фоне ингибирования p38 киназы, что указывало на антиапоптотические свойства последней. Эффект на каспазу-9 являлся p38 MAPK-зависимым. В условиях изменения внутриклеточной концентрации монооксида углерода p38 MAPK проявляла антиапоптотические свойства (табл. 12, 18, 22).

Таким образом, p38-зависимыми являются изменения экспрессии генов белков-регуляторов и ингибиторов апоптоза при действии монооксида углерода (50 мкМ), сульфида водорода (10 мМ) и оксида азота в высокой концентрации (100мМ), действие оксида азота в низкой концентрации (100мкМ) реализуется без вовлечения p38.



## 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. Однако, причины указанных событий при действии газов разные. Так, оксид азота в концентрации 100 мкМ изменяет экспрессию генов *bcl-2*, *bcl-x1*, *bad* и *baх*, и повышает содержание протеина *Bcl-2* и *Bad*. Оксид азота в концентрации 100 мМ и сульфид водорода также изменяют экспрессию генов *bcl-2*, *bcl-x1*, *bad* и *baх*, 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.

Действие монооксида углерода приводит к дисбалансу белков семейства *Bcl-2*: повышению содержания проапоптотического белка *Bad* и снижению содержания антиапоптотических белков *Bcl-2* и *Bcl-x1*. Кроме того, действие CO сопровождается снижением содержания белка-ингибитора каспаз – *xIAP*, что также вносит вклад в повышение активности каспаз-3 и -9 (рис. 40). Учитывая результаты проведенных исследований, можно сделать вывод о том, что в комплексной терапии злокачественных новообразований могут быть использован монооксид углерода, ввиду своей избирательности действия на опухолевые клетки в концентрации, не превышающей физиологическую, а также влияния на экспрессию генов, реализующегося в содержании соответствующих белков (повышения содержания проапоптотического белка *Bad* и снижения содержания антиапоптотических протеинов *Bcl-2*, *Bcl-X1* и *Aven*).

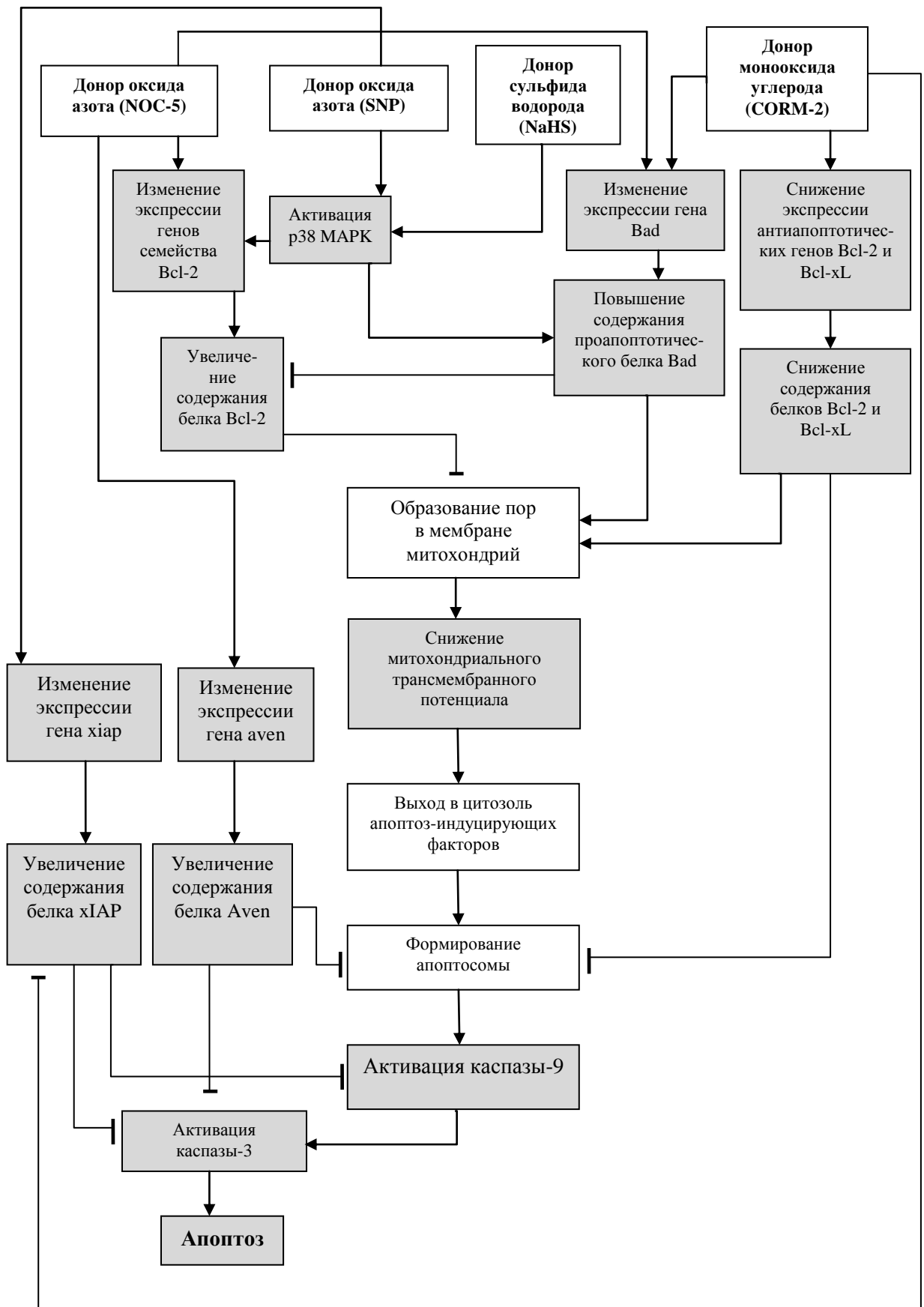


Рис. 40. Механизмы развития апоптоза при действии доноров газовых транмиттеров в опухолевых клетках линии Jurkat [по данным S. Elmore (2007) и результатам собственных исследований (выделено серым цветом)].

**Выводы:**

1. Особенности влияния доноров внутриклеточных газовых транзиттеров (SNP, NOC-5, NaHS и CORM-2) на реализацию апоптоза клеток крови *in vitro* определяются избирательностью, временем воздействия на клетки и носят дозозависимый характер (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 повышают количество апоптотически измененных клеток опухолевой линии Jurkat и не оказывают данного эффекта на мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров).

2. Общим механизмом проапоптотического действия доноров NO, H<sub>2</sub>S и CO является повышение количества клеток со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом и повышение активности каспазы-3.

3. Доноры оксида азота (SNP и NOC-5) способствуют внутриклеточному p38 MAPK-зависимому повышению содержания белка-ингибитора каспаз xIAP. Донор монооксида углерода p38-опосредованно подавляет экспрессию гена xiap, что приводит к снижению содержания соответствующего протеина и вносит вклад в активацию каспазы-9.

4. Действие на клетки доноров оксида азота (SNP) и сульфида водорода (NaHS) приводят к увеличению содержания белков Bcl-2 и Bad на фоне снижения экспрессии соответствующих генов, кроме того влияние доноров оксида азота обуславливает NO-опосредованную сверхэкспрессию гена bax. Действие на клетки донора монооксида углерода (CORM-2) вызывает снижение содержания антиапоптотических протеинов Bcl-2 и Bcl-xL, повышение содержания белка Bad и подавление экспрессии кодирующих их генов.

5. Действие доноров газотранзиттеров (SNP и CORM-2) на клетки линии Jurkat *in vitro* приводит к повышению готовности клеток к запуску

апоптоза через TNFR1. Донор NOC-5 не оказывает влияния на систему TNF $\alpha$ -TNFR1 в опухолевых клетках.

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

### Список использованных сокращений

АФК – активные формы кислорода  
 MAPK - митоген-активируемые протеинкиназы  
 мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота  
 ПЦР – полимеразная цепная реакция  
 ФИТЦ – флюоресцеинизотиоцианат  
 $\Delta\psi$  – митохондриальный трансмембранный потенциал  
 AIF – апоптоз-индуцирующий фактор  
 ANT – транслокатор адениловых нуклеотидов  
 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  
 CO – монооксид углерода  
 CORM – CO-высвобождающая молекула  
 ERK – внеклеточная сигнал-регулирующая киназа  
 FADD – Fas-ассоциированный белок домена смерти  
 H<sub>2</sub>S – сульфид водорода  
 HIF – гипоксия-индуцибельный фактор  
 HO – гемоксигеназа  
 I $\kappa$ B – ингибитор карра В  
 IKK – I $\kappa$ B-киназа  
 IL – интерлейкин

JNK – c-Jun N-терминальная киназа

LPS – липополисахарид

NF- $\kappa$ B – ядерный фактор «каппа-би»

NO – оксид азота

NOS – NO-синтаза

PI3K-Akt-mTOR – фосфоинозитид-3-киназа-альфа серин/треониновая протеинкиназа-мишень рапамицина у млекопитающих

SNP – нитропруссид натрия

STAT – сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции

TNFR1 – рецептор фактора некроза опухоли I типа

TNF $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$

TRADD – TNFR1- ассоциированный белок домена смерти

VDAC – порин-вольтаж зависимый канал

xIAP – связанный белок-ингибитор апоптоза

### Список использованной литературы

1. Барышников А. Ю. Иммунологические проблемы апоптоза / А. Ю. Барышников, А. В. Шишкин – М., 2002. – 320 с.
2. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств / Монография.–М.–2004.–С.222.
3. Гуревич К.Г. Оксид азота: биосинтез, механизмы действия, функции / К.Г. Гуревич, Н.Л. Шимановский // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2000. – № 4. – С. 16-22.
4. Донор оксида азота повышает эффективность цитостатической терапии и задерживает развитие лекарственной резистентности / Н.П. Коновалова, С.А. Гончарова, Л.М. Волкова и др. // Вопр. онкологии. - 2003. - Т.: 49, № : 1. - С. 71-75.
5. Кондакова И.В. Влияние доноров оксида азота на противоопухолевый эффект доксорубина / И.В. Кондакова, Г.В. Какурина, Е.Л. Чойнзон // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – №2 (116). – с. 92-95.
6. Меньшикова, Е.Б. Оксид азота и NO – синтазы при различных функциональных состояниях / Е.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков, В.П. Реутов // Биохимия. - 2000. – Т. 65, № 4. – С. 485–503.
7. Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций / С. Я. Проскуряков, С. И. Бикетов, А. И. Иванников и др. // Иммунология. – 2000. – № 4. - С. 9 – 19.
8. Патрушев Л. И. Экспрессия генов / Патрушев Л. И. — М.: Наука, 2000.
9. Регуляторная роль оксида азота в апоптозе нейтрофилов / Степовая Е.А., Жаворонок Т.В., Стариков Ю.В. и др // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. - Том 146. - № 12. – с. 646-650.
10. Реутов В.П. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности / В.П. Реутов // Биохимия. – 2002. – Т. 67, №3. – С. 353–376.

11. Самуилов В.Д. Программируемая клеточная смерть / Самуилов В.Д., Олексин А.В., Лагунова Е.М. // Биохимия, 2000. - Т.65, вып.8.- С. 1029-1046.
12. Сомова Л.М. Оксид азота как медиатор воспаления / Л.М. Сомова Н.Г. Плехова // Вестник ДВО РАН. - 2006. - № 2. – С. 77 – 80.
13. Фильченко А.А., Стойка Р.С. Апоптоз и рак / Под ред. А.И —.азеоКыБ .281.с —.9991 ,ноироМ :.К
14. Фильченков А.А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций / Фильченков А.А. // Биохимия, 2003.- Т.68, вып.4.- с.453-466.
15. Шиманская Т.В. Роль оксида азота в модуляции открытия митохондриальных пор при ишемии/реперфузии изолированного сердца / Шиманская Т.В., Добровольский Ф.В., Сагач В.Ф. // Актуальные проблемы транспортной медицины, 2007. - № 3 (9). – с. 121-126.
16. Ярилин А. А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // Актуальные проблемы патофизиологии / Под ред. Б. Б. Мороза. – М., 2001. – С. 13-56.
17. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis / Srinivasula S.M., Hegde R., Saleh A. et al. // Nature. – 2001. – Vol. 410(6824). – P. 112 – 6.
18. A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons / Riccio A., Alvania R.S., Lonze B.E. et al. // Mol. Cell. – 2006. – Vol. 21. – P. 283 – 294.
19. A role for the p38 mitogen activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents / Sanchez-Prieto R., Rojas J.M., Taya Y. et al. // Cancer Res. – 2000. – Vol. 60. – P. 2464 – 72.
20. Abu-Soud H.M. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases / Abu-Soud H.M., Hazen S.L. // J Biol Chem. - 2000. - Vol. 275. – P. 37524–37532.

21. Adaptive responses and apoptosis in endothelial cells exposed to carbon monoxide / Thom S.R., Fisher D., Xu Y.A. et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2000. – Vol. 97. – P. 1305 – 1310.
22. Adenovirus-mediated transfer and overexpression of heme oxygenase 1 cDNA in lung prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis via a Fas-Fas ligand-independent pathway / Tsuburai T., Suzuki M., Nagashima Y. et al. // *Hum Gene Ther*. – 2002. – Vol. 13. – P. 1945 – 1960.
23. Allyl disulfide as donor and cyanide as acceptor of sulfane sulfur in the mouse tissues / Iciek M., Bilaska A., Ksiazek L. et al. // *Pharmacol Rep*. – 2005. – Vol. 57. – P. 212 – 218.
24. Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis / Choi H.S., Rai P.R., Chu H.W. et al. // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2002. – Vol. 166. – P. 178 – 186.
25. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes / Hill M.M., Adrain C., Duriez P.J. et al. // *Embo J*. – 2004. – Vol. 23. – P. 2134 – 45.
26. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of *Sedum sarmentosum* extract / Jung H. J., Kang H. J., Song Y. S. et al. // *Journal of ethnopharmacology*. – 2008. – Vol. 116. – P. 138 - 143.
27. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome / Marsden V.S., O'Connor L., O'Reilly L.A. et al. // *Nature*. – 2002. – Vol. 419(6907). – P. 634 – 7.
28. Aven and Bcl-xL enhance protection against apoptosis for mammalian cells exposed to various culture conditions / Figueroa B.Jr., Chen S., Oyler G.A. et al. // *Biotechnology and bioengineering*. – 2004. - Vol. 85, No. 6. – P. 104.
29. Aven blocks DNA damage-induced apoptosis by stabilising Bcl-xL / Kutuk O., Temel S.G., Tolunay S. et al. // *Eur J Cancer*. – 2010. – Vol. 46(13). – P. 2494 – 505.
30. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1 / Chau B.N., Cheng E.H., Kerr D.A. et al. // *Mol Cell*. – 2000. – Vol. 6. – P. 31 – 40.



31. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis / Nechushtan A., Smith C.L., Lamensdorf I. et al. // *J Cell Biol.* – 2001. – Vol. 153(6). – P. 1265 – 76.
32. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria / Antonsson B., Montessuit S., Lauper S. et al. // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 345. – P. 271-8.
33. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions / Borner C. // *Mol Immunol.* – 2003. – Vol. 39. – P. 615 - 47.
34. Borutaite V. Nitric oxide donors, nitrosothiols and mitochondrial respiration inhibitors induce caspase activation by different mechanisms / Borutaite V., Morkuniene R., Brown G.C. // *FEBS Lett.* - 2000. - 467, № 23. - P. 155 - 159.
35. Bouillet P. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death / Bouillet P., Strasser A. // *J Cell Sci.* – 2002. – Vol. 115. – P. 1567 - 74.
36. Broom O.J., Widjaya B., Troelsen J. et al. Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease? / Broom O.J., Widjaya B., Troelsen J. et al. // *Clinical and Experimental Immunology.* -2009. – Vol. 158. – P. 272–280.
37. Brown G. C. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria / Brown G. C., Bal-Price A. // *Molecular neurobiology.* – 2003. – Vol. 27. – P. 325 - 355.
38. Budd R.C. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis / Budd R.C. // *J. Clin. Invest.* - 2002.- V. 109. - P. 437 - 442.
39. Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation / Leffler C.W., Parfenova H., Jaggar J.H. et al. // *J Appl Physiol.* – 2006. – Vol. 100. – P. 1065 – 1076.
40. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis / Brouard S., Otterbein LE., Anrather J. et al. // *J Exp Med.* – 2000. – Vol. 192. – P. 1015 – 1026.

41. Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells / Liu X.M., Chapman G.B., Peyton K.J. et al. // *Cardiovasc Res.* – 2002. – Vol. 55. – P. 396 – 405.
42. Carbon monoxide promotes Fas/CD95-induced apoptosis in Jurkat cells / Song R., Zhou Z., Kim P.K. et al. // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 44327 – 44334.
43. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase-1 / Zuckerbraun B.S., Billiar T.R., Otterbein S.L. et al. // *J Exp Med.* – 2003. – Vol. 198. – P. 1707 – 1716.
44. Carbon monoxide protects pancreatic  $\beta$ -cells from apoptosis and improves islet function/survival after transplantation / Gunther L., Berberat P.O., Haga M. et al. // *Diabetes.* – 2002. – Vol. 51. – P. 994–999.
45. Cardioprotection by hydrogen sulfide: suspended animation, inflammation, and apoptosis / Baumgart K., Georgieff M., Radermacher P. et al. // *Shock.* – 2009. – Vol. 31. – P. 218 - 219.
46. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways / Hu Y., Chen X., Pan T.T. et al. // *Pflugers Arch.* – 2008. – Vol. 455. – P. 607 – 616.
47. Caspases and cancer: mechanism of inactivation and new treatment modalities / Philchenkov A., Zavelevich M., Krocak T.J. et al. // *Exp Oncol.* – 2004. – Vol. 26. – P. 82 – 97.
48. Catalytic consumption of nitric oxide by prostaglandin H synthase-1 regulates platelet function / V.B. O'Donnell, B. Coles, M.J. Lewis et al. // *J Biol Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 38239–38244.
49. Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis / Inguaggiato P., Gonzalez-Michaca L., Croatt A.J. et al. // *Kidney Int.* – 2001. – Vol. 60. – P. 2181 – 2191.
50. Chang H.Y. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases / Chang H.Y., Yang X. // *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* – 2000. – V. 64. – P. 821-846.

51. Changes in cell culture temperature alter release of inflammatory mediators in murine macrophagic RAW264.7 cells / Hagiwara S., Iwasaka H., Matsumoto S. et al. // *Inflamm Res.* – 2007. – Vol. 56. – P. 297 – 303.
52. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes / Rubio-Moscardo F., Blesa D., Mestre C. et al. // *Blood.* – 2005. – Vol. 106. – P. 3214 – 22.
53. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene / Hayashi S., Omata Y., Sakamoto H. et al. // *Gene*, 2004. – Vol. 336. – P. 241–250.
54. Chen K. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38 / Chen K., Maines M.D. // *Cell Mol Biol.* – 2000. – Vol. 46. – P. 609 - 17.
55. Chen X. Production of the neuromodulator H<sub>2</sub>S by cystathionine  $\beta$ -synthase via the condensation of cysteine and homocysteine / Chen X., Jhee K.H., Kruger W.D. // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 52082 – 52086.
56. Cory S. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch / Cory S., Adams JM. // *Nat Rev Cancer.* – 2002. – Vol. 2(9). – P. 647 – 56.
57. CREB transcription factor modulates Bcl2 transcription in response to C5a in HL-60-derived neutrophils / Perianayagam M.C., Madias N.E., Pereira B.J. et al. // *Eur J Clin Invest.* – 2006. – Vol. 36. – P. 353-361.
58. Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium / Dorman D.C., Moulin F.J.M., McManus B.E. et al. // *Toxicol Sci.* – 2002. – Vol. 65. – P. 18 – 25.
59. Dan H.C. Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) / Dan H.C., Sun M., Kaneko S. // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 5405 – 5412.
60. Davies R. Signal Transduction by the JNK group of MAPKs / Davies R. // *Cell.* – 2000. – Vol. 103. – P. 239 – 252.

61. Davies S.P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors / Davies S.P. // *Biochem. J.* – 2000. – Vol. 351. – P. 95 – 105.
62. Denault J.B. Caspases: keys in the ignition of cell death / Denault J.B., Salvesen G.S. // *Chem Rev.* - 2002. – Vol. 102(12). – P. 4489 – 500.
63. Dickinson R.J. Diverse physiological functions for dualspecificity MAP kinase phosphatases / Dickinson R.J., Keyse S.M. // *J Cell Sci.* – 2006. – Vo. 119. – P. 4607 – 4615.
64. Different effects of constitutive nitric oxide synthase and heme oxygenase on pulmonary or liver metastasis of colon cancer in mice / Ishikawa T., Yoshida N., Higashihara H. et al. // *Clin Exp Metastasis.* – 2003. – Vol. 121. – P. 532 – 539.
65. Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of preconditioning / Bolli R., Shinmura K., Tang X.L. et al. // *Cardiovasc.* – 2002. – Vol. 55. – P. 506 – 519.
66. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics / Letai A., Bassik M.C., Walensky L.D. et al. // *Cancer Cell.* – 2002. – Vol. 2(3). – P. 183 – 92.
67. Distinctive regulation and function of PI 3K/Akt and MAPKs in doxorubicin-induced apoptosis of human lung adenocarcinoma cells / Zhao Y., You H., Yang Y. et al. // *J Cell Biochem.* – 2004. – Vol. 91. – P. 621 – 32.
68. Dulak J. Carbon monoxide — a “new” gaseous modulator of gene expression / Dulak J., Jozkowicz A. // *Acta Biochimika Polonica.* – 2003. – Vol. 50, No. 1.- p. 31–47
69. Effect of mycophenolate mofetil on severity of nephritis and nitric oxide production in lupus-prone MRL/lpr mice / Lui S.L., Tsang R., Wong D. et al. // *Lupus.* – 2002. – Vol. 11. – P. 411 – 418.
70. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death / Elmore S. // *Toxicologic Pathology.* – 2007. – Vol. 35. – P. 495 – 516.

71. Frankel D. Role of heme oxygenase-1 in the regulation of manganese superoxide dismutase gene expression in oxidatively-challenged astroglia / Frankel D., Mehindate K., Schipper H.M. // *J Cell Physiol.* – 2000. – Vol. 185. – P. 80 – 86.
72. Ghobrial I.M. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy / Ghobrial I.M., Witzig T.E., Adjei A.A. // *CA Cancer J Clin.* – 2005. – Vol. 55. – P. 178–94.
73. Gross A. A new Aven-ue to DNA-damage checkpoint / Gross A. // *Trends in Biochemical Sciences.* – 2008. – Vol. 33. – P. 514 – 516.
74. Heckman C.A. NF-kappaB activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells / Heckman C.A., Mehew J.W., Boxer L.M. // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21(24). – P. 3898 - 908.
75. Heme oxygenase 1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway / Ke B., Buelow R., Shen X.D. et al. // *Hum Gene Ther.* – 2002. – Vol. 13. – P. 1189 – 1199.
76. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression / Chauveau C., Remy S., Royer P.J. et al. // *Blood.* – 2005. – Vol. 106. – P. 1694 – 1702.
77. Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway / Busserolles J., Megias J., Terencio M.C. et al. // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2006. – Vol. 38. – P. 1510 – 1517.
78. Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts / Petrache I., Otterbein L.E., Alam J. et al. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2000. – Vol. 278. – P. 312 – 319.
79. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide is an autocrine inhibitor of vascular smooth muscle cell growth / Peyton K.J., Reyna S.V., Chapman G.B. et al. // *Blood.* – 2002. – Vol. 99. – P. 4443 – 8.
80. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor

- necrosis factor-alpha-mediated apoptosis / Brouard S., Berberat P.O., Tobiasch E. et al. // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277(20). – P. 17950-61.
81. Hochedlinger K. Differential effects of JNK1 and JNK2 on signal specific induction of apoptosis / Hochedlinger K., Wagner E.F., Sabapathy K. // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21. – P. 2441 – 2445.
  82. Hu W.H. Activation of NFkappaB by FADD, Casper, and caspase-8 / Hu W.H., Johnson H., Shu H.B. // *J. Biol. Chem.*- 2000.- V. 275.- P. 10838-10844.
  83. Huycke M.M. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models / Huycke M.M., Gaskins H.R. // *Exp Biol Med (Maywood)* – 2004. – Vol. 229. – P. 586 – 597.
  84. Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK–NF-κB pathway / Zhi L., Ang A.D., Zhang H. et al. // *J Leukoc Biol.* – 2007. – Vol. 81. – P. 1322 – 1332.
  85. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis / Papapetropoulos A., Garcia-Cardena G., Madri J.A. et al. // *PNAS.* – 2009. – Vol.106. - N. 51. – P. 21972–21977.
  86. Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase-3 / Rinaldi L., Gobbi G., Pambianco M. et al. // *Lab Invest.* – 2006. – Vol. 86. – P. 391 – 397.
  87. Hydrogen sulfide protects colon cancer cells from chemopreventative agent β-phenylethyl isothiocyanate induced apoptosis / Rose P., Moore P.K., Ming S.H. et al. // *World J Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11. – P. 3990 – 3997.
  88. Hyperphosphorylation of tau is mediated by ERK activation during anticancer drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells / Guise S., Braguer D., Carles G. et al. // *J Neurosci Res.* – 2001. – Vol. 63. – P. 257 – 67.
  89. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-βB activation, and TNFα-dependent apoptosis / Varfolomeev E., Blankenship J.W., Wayson S.M. et al. // *Cell.* – 2007. – Vol. 131. – P. 669 – 681.

90. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins / Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M. et al. // *Cell*. – 2000. – Vol. 102(1). – P. 43 – 53.
91. Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia / Mayerhofer M., Florian S., Krauth M.T. et al. // *Cancer Res*. – 2004. – Vol. 7. – P. 47 – 55.
92. Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach / Sultana R., Poon H.F., Cai J. et al. // *Neurobiol Dis*. – 2006. – Vol. 22. – P. 76 – 87.
93. IL-15 maintains T-cell survival via S-nitrosylation-mediated inhibition of caspase-3 / Saligrama P.T., Fortner K.A., Secinaro M.A. et al. // *Cell Death Differ*. – 2014. – Vol. 6. – P. 904-14.
94. Induction of inducible nitric oxide synthase: a protective mechanism in colitis-induced adenocarcinoma / Zhang R., Ma A., Urbanski S.J. et al. // *Carcinogenesis*. – 2007. – Vol. 6. – P. 367 – 375.
95. Inhibition of invasion and epithelial-mesenchymal transition of human breast cancer cells by hydrogen sulfide through decreased phospho-p38 expression / Lv M., Li Y., Ji M.H. et al. // *Mol Med Rep*. – 2014. - Vol. 10(1). – P. 341-6.
96. Interaction between iNOS and COX-2 in hypoxia-induced retinal neovascularization in mice / He T., Xing Y. Q., Zhao X. H. et al. // *Archives of medical research*. – 2007. – Vol. 38. – P. 807 – 815.
97. Johnson G.L. Role of mitogen-activated protein kinase kinases in signal integration / Johnson G.L., Cuevas B.D., Abell A.N. // *Oncogene*. – 2007. – Vol. 26. – P. 3159 – 3171.
98. Jozkowicz A. Heme Oxygenase-1 in Tumors Is It a False Friend / Jozkowicz A., Was H., Dulak J. // *Antioxid Redox Signal*. – 2007. – Vol. 9(12). – P. 2099 – 2118.
99. Kamoun P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals / Kamoun P. // *Amino Acids*. – 2004. – Vol. 26. – P. 243 – 254.

100. Kato Y. Role of BMK1 in regulation of growth factor-induced cellular responses / Kato Y. // *Immunol. Res.* – 2000. – Vol. 21. – P. 233 – 237.
101. Keramati A.R. The role of Akt/PI3Kinase and ERK1/2 activation on expression of XIAP and proliferation of HT-29 cells / Keramati A.R., Goliaei A., Abkhezr M. // *Proceeding of 10th Iranian Pharmaceutical Science Conference.* – 2008. – Aug. 21–24. – P. 308
102. Khan S.A. The role of nitric oxide in the physiological regulation of Ca<sup>2+</sup> cycling / S.A. Khan, J.M. Hare // *Curr Opin Drug Discov Devel.* - 2003. - Vol. 6, N5. - P.658–666.
103. Kietzmann T. Transcriptional regulation of heme oxygenase-1 gene expression by MAP kinases of the JNK and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes / Kietzmann T., Samoylenko A., Immenschuh S. // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 17927 – 36.
104. Kim Y. M. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms / Kim Y. M., Talanian R. V., Billiar T. R. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 31138 – 31148.
105. Kimura H. Hydrogen sulfide as a neuromodulator / Kimura H. // *Mol Neurobiol.* – 2002. – Vol. 26. – P. 13 – 19.
106. Koehler R. Cerebrovascular effects of carbon monoxide / Koehler R., Traystman R.J. // *Antioxid Redox Signal.* – 2002. – Vol. 4. – P. 279 – 290.
107. Kourembanas S. Hypoxia and carbon monoxide in the vasculature / Kourembanas S. // *Antioxid Redox Signal.* – 2002. – Vol. 4. – P. 291 – 9.
108. Kroemer G. Mitochondrial control of cell death / Kroemer G., Reed J.C. // *Nat Med.* – 2000. – Vol. 6. – P. 513 - 9.
109. Kuhn K. Mechanisms of sodium nitroprusside-induced death in human chondrocytes / Kühn K., Lotz M. // *Rheumatol Int.* – 2003. – Vol. 23. – P. 241 – 247.
110. Lala P.K. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression / Lala P.K., Chakraborty C. // *Lancet Oncol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 149 – 156.



111. Lee T.J. Nitric oxide and the cerebral vascular function / Lee T.J. // *J Biomed Sci.* – 2000. – Vol. 7. – P. 16 – 26.
112. Lee T.S. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice / Lee T.S., Chau L.Y. // *Nat Med.* – 2002. – Vol. 6. – P. 541 – 549.
113. Li J. Caspases in apoptosis and beyond / Li J., Yuan J. // *Oncogene.* – 2008. – Vol. 27. – P. 6194 – 206.
114. Li L.Y. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria / Li L.Y., Luo X., Wang X. // *Nature.* – 2001. – Vol. 412(6842). – P. 95 – 9.
115. Liu V.W. Cardiovascular roles of nitric oxide: A review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice / Liu V.W., Huang P.L. // *Cardiovasc Res.* – 2008. – Vol. 77. – P. 19 – 29.
116. Locksley R.M. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology / Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. // *Cell.* – 2001. – Vol. 104. – P. 487 – 501.
117. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) – the third gas of interest for pharmacologists / Lowicka E., Beltowski J. // *Pharmacol Rep.* – 2007. – Vol. 59. – P. 4 – 24.
118. Martinvalet D. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis / Martinvalet D., Zhu P., Lieberman J. // *Immunity.* – 2005. – Vol. 22. – P. 355 – 70.
119. Mechanism of induction of pancreatic acinar cell apoptosis by hydrogen sulfide / Cao Y, Adhikari S, Ang AD et al. // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2006. – Vol. 291. – P. 503 – 10.
120. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo / Brancho D., Tanaka N., Jaeschke A. et al. // *Genes Dev.* – 2003. – Vol. 17. – P. 1969 – 1978.
121. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria / Garrido C., Galluzzi L., Brunet M. et al. // *Cell Death Differ.* – 2006. – Vol. 13. – P. 1423–33.

122. Messmer U. K. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signaling pathways / Messmer U. K., Brune B. // *Biochem. J.* – 1996. – Vol. 319. – P. 299 – 305.
123. Mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway regulates heme oxygenase-1 gene expression by hypoxia in vascular cells / Ryter S.W., Xi S., Hartsfield C.L. et al. // *Antioxid Redox Signal.* – 2002. – Vol. 4. – P. 587 – 92.
124. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions / Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T. et al. // *Endocr Rev.* – 2001. – Vol. 22. – P. 153 – 83.
125. Monoclonal ribosomal P autoantibody inhibits the expression and release of IL-12, TNF-alpha and iNOS in activated RAW macrophage cell line / Sun K. H., Tang S. J., Chen C. Y. et al. // *Journal of autoimmunity.* – 2005. – Vol. 24. – P. 135 – 143.
126. Murakami A. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals / Murakami A., Ohigashi H. // *International journal of cancer.* – 2007. – Vol. 121. – P. 2357 – 2363.
127. Mustafa A.K. Signaling by Gasotransmitters / Mustafa A.K., Gadalla M.M., Snyder S.H. // *Sci. Signal.*, – 2009. – Vol. 2. – P. 1 – 17.
128. Myricetin Protects Cells against Oxidative Stress-Induced Apoptosis via Regulation of PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways / Wang Z.H., Kang K.A., Zhang R. et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2010. – Vol. 11. – P. 4348 – 4360.
129. Nagata S. Apoptosis by death factor / Nagata S. // *Cell.* – 1997. – Vol. 88. – P. 355 – 365.
130. Naito Y. Heme oxygenase and carbon monoxide: medicinal chemistry and biological effects / Naito Y. // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2008. – Vol. 42. – P. 76–77.
131. Nathan C. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens / Nathan C., Shiloh M.U. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 8841 – 8848.

132. Nebreda A.R. p38 MAP kinases: beyond stress response / Nebreda A.R., Porras A. // *TIBS*. – 2000. – Vol. 25. – P. 257 – 60.
133. Nitric oxide and carbon monoxide act as inhibitory neurotransmitters in the longitudinal muscle of C57BL/6J mouse distal colon / Hidaka A., Azuma Y.T., Nakajima H. et al. // *J Pharmacol Sci*. – 2010. – Vol. 112(2). – P. 231 – 41.
134. Nitric Oxide as a Pro-apoptotic as well as Anti-apoptotic Modulator / Choi B.M., Pae H.O., Jang S. et al. // *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 35. – P. 116-126.
135. Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology / N. Tuteja, M. Chandra, R. Tuteja et al. // *J Biomed Biotechnol*. - 2004. - N4. - P. 227–237.
136. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9 / Torok N.J., Higuchi H., Bronk S. et al. // *Cancer Res*. – 2002. – Vol. 62(6). –P. 1648 – 53.
137. Nitric oxide modulates interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha synthesis by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis / Kuo H.P., Wang C.H., Huang K.S. et al. // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2000. – Vol. 161. – P. 192 – 199.
138. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8 / Kim Y. M., Kim T. H., Chung H. T. et al. // *Hepatology*. – 2000. – Vol. 32. – P. 770 – 778.
139. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease / Carreras M. C., Franco M. C., Peralta J. G. et al. // *Molecular aspects of medicine*. – 2004. – Vol. 25. – P. 125 - 139.
140. Nitric oxide-induced apoptosis in cultured rat astrocytes protection by edaravone, a radical scavenger / Kawasaki T., Kitao T., Nakagawa K. et al. // *Glia*. – 2007. – Vol. 55. – P. 1325 – 1333.

141. Olson S.Y. Regulation of Apoptosis-Related Genes by Nitric Oxide in Cancer / Olson S.Y., Garban H.J. // Nitric Oxide. – 2008. – Vol. 19(2). – P. 170–176.
142. Ono K. The p38 signal transduction pathway: Activation and function / Ono K., Han J. // Cell Signal. – 2000. – Vol. 12. – P. 1 – 13.
143. Overexpression of the anti-apoptotic protein AVEN contributes to increased malignancy in hematopoietic neoplasms / Eissmann M., Melzer I.M., Fernandez S.B. et al. // Oncogene. – 2013. – Vol.32(20). – P.2586-91.
144. p38 mitogen-activated protein kinase mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in rat fetal brown adipocytes / Valladares A., Alvarez A.M., Ventura J.J. et al. // Endocrinology. – 2000. – Vol. 141. – P. 4383 – 95.
145. Pance A. Nitric oxide and hormones in breast cancer: allies or enemies? / Pance A. // Future oncology. – 2006. – Vol. 2. – P. 275 – 288.
146. Physiology of apoptosis / Gulbins E., Jekle A., Ferlinz K. et al. // Am. J. Physiol. Renal Physiol.- 2000.- V. 279.- P. 605-615.
147. PI3-K/Akt-dependent activation of cAMP-response element-binding (CREB) protein in Jurkat T leukemia cells treated with TRAIL / Caravatta L., Sancilio S, di Giacomo V. et al. // J Cell Physiol. – 2008. – Vol. 214. – P. 192-200
148. Pilz R.B. Regulation of gene expression by cyclic GMP / Pilz R.B., Casteel D.E. // Circ Res. – 2003. – Vol. 93. – P. 1034–1046.
149. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death / Wei M.C., Zong W.X., Cheng E.H. et al. // Science. – 2001. – Vol. 292(5517). – P. 727 – 30.
150. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters / Hess D.T., Matsumoto A., Kim S.O. et al. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2005. – Vol. 6. – P. 150 – 166.
151. Puthalakath H. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins / Puthalakath H., Strasser A. // Cell Death Differ. – 2002. – Vol. 9(5). – P. 505 – 12.

152. Regulation of Bcl-xL expression in lung vascular smooth muscle / Suzuki Y.J., Nagase H., Wong C.M. et al. // *Am J Respir Cell Mol Biol* - 2007. – Vol. 36. – P. 678–687.
153. Regulation of c-fos, c-jun and c-myc gene expression by angiotensin II in primary cultured rat astrocytes: role of ERK1/2 MAP kinases / Delaney J., Chiarello R., Villar D. et al. // *Neurochem Res.* – 2008. – Vol. 33. – P. 545 – 50.
154. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol / Martin D., Rojo A.I., Salinas M. et al. // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 8919 – 8929.
155. Regulation of HIF-1 $\alpha$  stability through S-nitrosylation / Li F., Sonveaux P., Rabbani ZN. et al. // *Mol. Cell.* – 2007. – Vol. 26. - P. 63 – 74.
156. Regulation of NF- $\kappa$ B and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor / Rocha S., Garrett M.D., Campbell K.J. et al. // *EMBO J.* – 2005. – Vol. 24(6). – P. 1157–1169.
157. Ricciardolo F. L. Nitric oxide synthase (NOS) as therapeutic target for asthma and chronic obstructive pulmonary disease / Ricciardolo F. L., Nijkamp F. P., Folkerts G. // *Current drug targets.* – 2006. – Vol. 7. – P. 721 – 735.
158. Riedl S.J. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis / Riedl S.J., Shi Y. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2004. – Vol. 5. – P. 897 – 907.
159. Role of nitric oxide in host defense in murine salmonellosis as a function of its antibacterial and antiapoptotic activities / Alam M.S., Akaike T., Okamoto S. et al. // *Infect Immun.* – 2002. – Vol. 70. – P. 3130 – 3142.
160. Role of nitric oxide in tumor growth / Jenkins D.C., Charles I.G., Thomsen L.L. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 92. – P. 4392 – 6.
161. Salvesen G.S. Caspase mechanisms / Salvesen G.S., Riedl S.J. // *Adv Exp Med Biol.* – 2008. – Vol. 615. – P. 13 – 23.

162. Sartorius U. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis / Sartorius U., Schmitz I., Krammer P.H. // *Chembiochem.* – 2001. – Vol. 2(1). – P. 20 – 9.
163. Schulz R. Nitric oxide in myocardial ischemia/ reperfusion injury / Schulz R., Kelm M., Heusch G. // *Cardiovasc Res.* – 2004. – Vol. 61. – P. 402 – 413.
164. Scorrano L. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members / Scorrano L., Korsmeyer S.J. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – Vol. 304(3). – P. 437 – 44.
165. Slow regulated release of H<sub>2</sub>S inhibits oxidative stress induced cell death by influencing certain key signaling molecules / Majid A.S., Majid A.M., Yin Z.Q., Ji D. // *Neurochem Res.* – 2013. – Vol.38(7). – P.1375-93.
166. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition / Du C., Fang M., Li Y. et al. // *Cell.* – 2000. – Vol. 102(1). – P. 33 - 42.
167. S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation / Azad N., Vallyathan V., Wang L. et al. // *The journal of biological chemistry.* – 2006. – Vol. 281(45). – P. 34124–34134.
168. S-Nitrosylation of matrix metalloproteinases: Signaling pathway to neuronal cell death / Gu Z., Kaul M., Yan B. et al. // *Science.* – 2002. – Vol. 297. – P. 1186 – 1190.
169. S-nitrosylation of peroxiredoxin 2 promotes oxidative stress-induced neuronal cell death in Parkinson's disease / Fang J., Nakamura T., Cho D.H. et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2007. – Vol. 104. – P. 18742 – 18747.
170. Stipanuk M.H. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine / Stipanuk M.H. // *Annu Rev Nutr.* – 2004. – Vol. 24. – P. 539 – 577.
171. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain / Huang Y., Park Y.C., Rich R.L. et al. // *Cell.* – 2001. – Vol. 104(5). – P. 781 – 90.

172. Survivin and *aven*: two distinct antiapoptotic signals in acute leukemias / Paydas S., Tanriverdi K., Yavuz S. et al. // *Annals of Oncology*. – 2003. – Vol. 14. – P. 1045 – 1050.
173. Suschek C. V. The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all? / Suschek C. V., Schnorr O., Kolb-Bachofen V. // *Current molecular medicine*. – 2004. – Vol. 4. – P. 763 – 775.
174. Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential / Szabo C. // *Nat Rev Drug Discov*. – 2007. – Vol. 6. – P. 917 – 935.
175. The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases-3 and -7 / Huang H., Joazeiro C.A., Bonfoco E. et al. // *J Biol Chem*. – 2000. – Vol. 275(35). – P. 26661 – 4.
176. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes / Saurin A.T., Martin J.L., Heads R.J. et al. // *FASEB J*. – 2000. – Vol. 14. – P. 2237 – 46.
177. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet / MacFarlane M., van Loo G., Saelens X. et al. // *Cell Death Differ*. – 2002. – Vol. 9. – P. 1031 – 1042.
178. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener / Zhao W., Zhang J., Lu Y. et al. // *Embo J*. – 2001. – Vol. 20. – P. 6008 – 6016.
179. Tian S. Interaction and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis by Raf-1 protein kinase / Tian S., Mewani R.R., Kumar D. // *Int J Oncol*. – 2006. – Vol. 29. – P. 861 – 867.
180. Toxic proteins released from mitochondria in cell death / Saelens X., Festjens N., Vande Walle L. et al. // *Oncogene*. – 2004. – Vol. 23. – P. 2861 – 74.
181. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-

- activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3 / Edlund S., Bu S., Schuster N. et al. // *Mol Biol Cell.* – 2003. – Vol. 14. – P. 529 – 44.
182. Tsujimoto Y. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins / Tsujimoto Y., Shimizu S. // *Cell Death Differ.* – 2000. – Vol. 7(12). – P. 1174 – 81.
183. Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells / Liu Z.M., Chen G.G., Ng E.K. et al. // *Oncogene.* – 2004. – Vol. 23. – P. 503 – 513.
184. Vaux D.L. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells / Vaux D.L., Cory S., Adams J.M. // *Nature.* – 1988. – Vol. 335(6189). – P. 440 – 2.
185. Walczak H. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) Apoptosis Systems / Walczak H., Krammer P.H. // *Exp. Cell Res.-* 2000.- V. 256.- P. 58-66.
186. Wang R. Carbon monoxide - endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications / Wang R., Wu L. // *Pharmacology Reviews*, 2005. – Vol. 57. – P. 585–630.
187. Wang R. The evolvement of gasotransmitter biology and medicine: from atmospheric toxic gases to endogenous gaseous signaling molecules, in *Signal Transduction and the Gasotransmitters: NO, CO and H<sub>2</sub>S in Biology and Medicine* / Wang R. – Humana Press, Totowa, 2004. – P. 3–32.
188. Wang R. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide / Wang R. // *Antioxid Redox Signal.* – 2003. – Vol. 5. – P. 493 – 501.
189. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? / Wang R. // *FASEB J.* – 2002. – Vol. 16. – P. 1792 – 1798.
190. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis / Jost P.J., Grabow S., Gray D. et al. // *Nature.* – 2009. – Vol.460(7258). – P.1035-9.



191. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes / Suzuki Y., Nakabayashi Y., Nakata K. et al. // *J Biol Chem.* – 2001. – Vol. 276(29). – P. 27058 – 63.
192. Yang G. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of MAP kinases and caspase-3 / Yang G., Sun X., Wang R. // *FASEB J.* – 2004. – Vol. 18. – P. 1782 – 1784.
193. Zabalgoitia M. Carbon monoxide donors or HO-1 overexpression block Interleukin-18-Mediated NF- $\kappa$ B-PTEN-Dependent human cardiac endothelial cell death / Zabalgoitia M., Colston J.T. // *Free Radic Biol Med.* – 2008. – Vol. 44(3). – P. 284 – 298.
194. Zarubin T. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway / Zarubin T., Han J. // *Cell Research.* – 2005. – Vol. 15. – P. 11 – 18.
195. Zhao W. H<sub>2</sub>S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms / Zhao W., Wang R. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2002. – Vol. 283. – P. 474 – 480.
196. Zhao W. Modulation of endogenous production of H<sub>2</sub>S in rat tissues / Zhao W., Ndisang J.F., Wang R. // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2003. – Vol. 81. – P. 848 – 853.