

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Сибирский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

**На правах рукописи**

**Носарева Ольга Леонидовна**

**Роль окислительной модификации белков и их деградации,  
тиолдисульфидной системы в механизмах дизрегуляции апоптоза при  
опухолевой прогрессии**

**14.03.03 – патологическая физиология**

**03.01.04 – биохимия**

**Диссертация**

**на соискание ученой степени доктора медицинских наук**

**Научные консультанты:**

**доктор медицинских наук, профессор**

**Рязанцева Наталья Владимировна**

**доктор медицинских наук, профессор**

**Степовая Елена Алексеевна**

**ТОМСК – 2016**

## Оглавление

Введение .....	5
Глава 1. Обзор литературы. Современные представления о роли редокс-баланса, окислительной модификации белков и их деградации в дизрегуляции апоптоза при опухолевом росте .....	15
1.1 Современные представления о молекулярных механизмах реализации апоптоза при опухолевом росте .....	15
1.1.1 Молекулярные особенности реализации программированной гибели клетки по рецепторному пути .....	16
1.1.2 Молекулярные особенности реализации программированной гибели клетки по митохондриальному пути .....	21
1.2 Современные представления о молекулярных механизмах формирования окислительного стресса в клетке при опухолевом росте .....	25
1.2.1 Роль активных форм кислорода в развитии окислительного стресса .....	26
1.2.2 Молекулярные механизмы окислительной модификации белков, их деградации и рефолдинга при окислительном стрессе .....	29
1.2.3 Состояние тиолдисульфидной системы при окислительном стрессе .....	37
1.3 Окислительный стресс и программированная гибель клеток в патогенезе опухолевого роста .....	42
1.3.1 Роль активных форм кислорода в дизрегуляции апоптоза .....	43
1.3.2 Окислительная модификация белков, их деградация и тиолдисульфидная система в дизрегуляции программированной гибели клетки .....	48
Глава 2. Материал и методы исследования .....	55
2.1 Материал исследования .....	55
2.1.1 Культивирование опухолевых клеток линии Jurkat .....	56
2.1.2 Выделение мононуклеарных лейкоцитов .....	57
2.1.3 Выделение лимфоцитов крови из мононуклеарной фракции .....	57
2.1.4 Определение количества CD5-презентирующих лимфоцитов крови .....	58

2.1.5	Моделирование экспериментальных процессов в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови .....	59
2.1.6	Приготовление лизатов лимфоцитов крови и опухолевых клеток линии Jurkat .....	65
2.2	Методы исследования .....	66
2.2.1	Оценка реализации апоптоза.....	66
2.2.2	Определение количества TNF RI-презентирующих клеток.....	68
2.2.3	Определение количества Fas-презентирующих клеток.....	69
2.2.4	Оценка митохондриального потенциала.....	71
2.2.5	Определение содержания Hsp27, Hsp70, убиквитина, убиквитинлигазы и транскрипционных факторов NF-κB, Araf-1 .....	72
2.2.6	Определение активности каспазы-3 .....	74
2.2.7	Определение концентрации активных форм кислорода .....	75
2.2.8	Оценка продукции гидроксильного радикала .....	76
2.2.9	Определение содержания восстановленного и окисленного глутатиона... ..	77
2.2.10	Определение концентрации SH-групп белков .....	78
2.2.11	Определение содержания белково-связанного глутатиона .....	79
2.2.12	Определение активности глутатионредуктазы .....	79
2.2.13	Определение активности тиоредоксинредуктазы .....	80
2.2.14	Определение активности глутатионпероксидазы .....	80
2.2.15	Определение содержания карбонильных производных белков .....	81
2.2.16	Определение содержания битирозина и окисленного триптофана.....	83
2.2.17	Оценка уровня экспрессии мРНК гена убиквитина.....	84
2.2.18	Определение концентрации общего белка .....	88
2.2.19	Статистическая обработка результатов исследования .....	88
Глава 3.	Результаты собственных исследований .....	90
3.1	Моделирование окислительного стресса <i>in vitro</i> в лимфоцитах крови.....	90
3.2	Параметры реализации и регуляции апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови .....	92

3.3	Параметры реализации и регуляции апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat при различных условиях культивирования .....	98
3.4	Оценка окислительного стресса в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови .....	110
3.5	Оценка окислительного стресса в опухолевых клетках линии Jurkat при различных условиях культивирования .....	111
3.6	Состояние тиолдисульфидной системы в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови .....	114
3.7	Состояние тиолдисульфидной системы в опухолевых клетках линии Jurkat при различных условиях культивирования .....	117
3.8	Оценка окислительной модификации белков в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови .....	123
3.9	Оценка окислительной модификации белков в опухолевых клетках линии Jurkat при различных условиях культивирования .....	125
3.10	Оценка убиквитин-зависимой деградации белков в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови .....	131
3.11	Оценка убиквитин-зависимой деградации белков в опухолевых клетках линии Jurkat при различных условиях культивирования.....	133
	Глава 4. Обсуждение результатов .....	138
4.1	Участие активных форм кислорода в регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови в условиях окислительного стресса <i>in vitro</i> .....	138
4.2	Роль компонентов тиолдисульфидной системы, окислительной модификации белков и убиквитин-зависимой деградации в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat .....	157
	Заключение .....	171
	Выводы .....	178
	Список использованных сокращений .....	180
	Список литературы .....	185

## Введение

**Актуальность темы исследования.** В настоящее время злокачественные новообразования занимают одну из ведущих позиций среди социально-значимых патологий, характеризующихся высокой заболеваемостью и смертностью [21]. Известно, что в основе патогенеза ряда патологических процессов, в том числе опухолевого роста, лежат развитие окислительного стресса и нарушение механизмов регуляции апоптоза, приводящие к «ускользанию» клеток от запрограммированной гибели [44, 108, 197, 375]. Одним из перспективных подходов решения этой проблемы является поиск редокс-зависимых молекулярных мишеней регуляции апоптоза.

Причинно-следственные связи между редокс-балансом клетки, активностью белков-эффекторов и белков-регуляторов, определяющих состояние клеточного метаболизма и функций, остаются большей частью неопределенными. Модуляция конформации белковых молекул представляет собой молекулярную технологию регуляции активности протеинов и биохимических процессов в клетках [206, 281]. Большой интерес представляет возможность влияния с помощью компонентов тиолдисульфидной системы, окислительной модификации белков и их деградации на различные физиологические и патологические процессы, в частности апоптоз нормальных и опухолевых клеток. В связи с этим, на сегодняшний день представляется крайне актуальным исследование роли и молекулярных механизмов глутатионилирования, убиквитинилирования белков в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток.

**Степень разработанности.** Актуальными являются работы по изучению регуляции апоптоза, инициируемого эндогенными или экзогенными воздействиями. Показано, что при патологиях различного генеза, сопровождающихся развитием окислительного стресса, в том числе и при опухолевом росте, активные формы кислорода, помимо универсальных

клеточных повреждающих агентов, могут выступать в роли модуляторов программы клеточной гибели [19, 45, 232, 267, 275].

В поддержание редокс-баланса клетки существенный вклад вносит тиолдисульфидная система. Важнейшими ее компонентами являются восстановленный глутатион и тиоредоксин, которые способны снижать деструктивное и цитотоксическое действие активных форм кислорода, выступая акцепторами гидроксильного радикала и синглетного кислорода [28, 60, 279, 473], а также являются участниками внутриклеточной сигнальной трансдукции, редокс-регуляции активности транскрипционных факторов, экспрессии генов [47, 165, 222, 344, 420]. Роль глутатиона во внутриклеточной редокс-регуляции опосредована образованием смешанных дисульфидов с тиоловыми группами протеинов [77, 223]. Тиоредоксин энзиматическим путем участвует в детиоляции глутатионилированных белков [472, 473]. Для поддержания функционального состояния компонентов тиолдисульфидной системы необходимы сопряженные эффекты тиоредоксина, глутатиона и НАДФН-зависимых редуктаз [279, 473].

Накопление окислительно-модифицированных белков в результате развития окислительного стресса способствует активации протеасомного пути их деградации с участием убиквитина [43, 62, 136, 282], а также индуцибельной наработке белков теплового шока (heat shock proteins – Hsp). Продемонстрировано, что факторы транскрипции могут изменять свою активность не только под влиянием компонентов редокс-чувствительных сигнальных систем, но и с помощью окислительной модификации. Шапероны участвуют в восстановлении нативной конформации белковых молекул и активности ферментов [26, 80, 98]. Кроме того, они тесно взаимодействуют с компонентами антиоксидантной системы [434], обладают анти- и проапоптотической функцией [462]. В условиях окислительного стресса факторы транскрипции, ферменты антиоксидантной защиты и апоптоза нуждаются в своевременном рефолдинге для поддержания их активности. Согласно современным представлениям, белки семейства Hsp70, одними из первых

реагируют на окислительный стресс, обладают свойствами ферментов, исправляющих конформационные изменения протеинов и способствуют трансмембранной транслокации белков. Процесс рефолдинга с помощью Hsp70 протекает более эффективно после ассоциации протеиновых агрегатов с белками теплового шока низкой молекулярной массы, в частности с Hsp27 [214, 432]. Поэтому выяснение роли Hsp в рефолдинге и дизрегуляции апоптоза является актуальной задачей медицины и биологии. Несмотря на то, что ряд молекулярных мишеней регуляции апоптоза определен, роль и молекулярные механизмы участия тиолдисульфидной системы, окислительной модификации белков и их убиквитин-зависимой деградации в реализации программированной гибели требуют дальнейшего изучения, так как они могут быть использованы для разработки способов управления апоптозом опухолевых клеток при злокачественных новообразованиях.

**Цель исследования:** установить молекулярные механизмы участия окислительно-модифицированных белков и убиквитин-зависимого пути деградации протеинов, тиолдисульфидной системы в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови при экспериментальном окислительном стрессе.

**Задачи исследования:**

1. Оценить роль окислительной модификации белков в механизмах нарушений регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови при окислительном стрессе *in vitro*.
2. Установить роль компонентов тиолдисульфидной системы в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови при экспериментальном окислительном стрессе.
3. Оценить участие убиквитина в механизмах нарушений регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови при экспериментальном окислительном стрессе.

4. Оценить влияние белков теплового шока 27 и 70 на окислительную модификацию белков и убиквитин-зависимую деградацию протеинов опухолевых клеток линии Jurkat.

5. Идентифицировать молекулярные мишени редокс-регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.

**Научная новизна.** Впервые получены новые знания фундаментального характера о молекулярных механизмах окислительной модификации белков, убиквитин-зависимом пути деградации протеинов, поддержании тиолдисульфидного баланса и их роли в редокс-зависимой дисрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии и экспериментальном окислительном стрессе. Индукцию апоптоза в лимфоцитах крови в условиях окислительного стресса *in vitro* вызывало накопление карбонильных производных белков, белково-связанного глутатиона на фоне возрастания концентрации Hsp27. Дисрегуляция запрограммированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat была опосредована изменением редокс-статуса, гиперпродукцией Hsp27, Hsp70 и убиквитина. В ходе проведенного исследования доказано, что компоненты тиолдисульфидной системы (восстановленный и окисленный глутатион, глутатионредуктаза, тиоредоксинредуктаза) представляют собой потенциальные молекулярные мишени управления апоптозом опухолевых клеток линии Jurkat.

Новыми являются данные, отражающие участие белков теплового шока 27 и 70 в условиях внутриклеточного редокс-модулирования (ингибирование синтеза глутатиона *de novo*, восстановление и блокирование SH-групп пептидов и белков) в изменении уровня карбонильных производных белков и белково-связанного глутатиона, активации убиквитин-зависимого пути деградации белков, сопровождающиеся активацией апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat. Показано, что проапоптотический эффект редокс-модуляции и ингибирования Hsp27 опосредован участием восстановленного, окисленного и белково-связанного глутатиона в реализации рецепторного и митохондриального путей апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat. При этом установлено, что

глутатионилирование и убиквитинилирование белков представляют собой редокс-зависимые молекулярные механизмы регуляции апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные в результате проведенного фундаментального исследования фактические данные о роли компонентов тиолдисульфидной системы, окислительной модификации белков, их деградации в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток расширяют представления о патогенезе опухолевого роста. С целью моделирования окислительного стресса в лимфоцитах крови, сопровождающегося редокс-зависимой реализацией апоптоза, установлена оптимальная конечная концентрация пероксида водорода (0,5 мМ) для добавления в среду инкубации клеток. Выявлено, что изменение редокс-статуса опухолевых клеток линии Jurkat в сторону восстановленности сопровождалось активацией апоптоза преимущественно за счет вовлечения в процесс глутатионилирования SH-групп белков, а при смещении редокс-статуса в сторону окисления – путем накопления необратимых карбонильных производных протеинов с последующей активацией убиквитин-зависимого пути деградации.

Проведенное исследование открывает новые возможности управления клеточной гибелью на уровне белковых молекул, отвечающих за передачу внутриклеточного сигнала, активацию/инактивацию факторов транскрипции, активность и направленность метаболических путей при опухолевой прогрессии и других свободно-радикальных патологиях протекающих с участием лимфоцитов крови. Новые знания фундаментального характера о роли компонентов тиолдисульфидной системы, окислительной модификации белков и их деградации, Hsp27 и Hsp70 в регуляции апоптоза могут стать основой для разработки способов коррекции нарушений в реализации летальной программы клеток при различных патологических состояниях, сопровождающихся формированием окислительного стресса. Полученные данные об особенностях участия тиолдисульфидной системы в окислительной модификации белковых

молекул и их деградации могут быть использованы для разработки новых технологий регуляции апоптоза опухолевых клеток.

**Методология и методы исследования.** В исследование были включены опухолевые клетки линии Jurkat («Т-лимфобластная лейкемия человека») (ФГБУН Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия) и лимфоциты крови, полученные у здоровых лиц.

Исследование было разделено на два этапа. Целью первого этапа явилось создание модели окислительного стресса в лимфоцитах крови путем экспериментального подбора оптимальной конечной концентрации пероксида водорода (0,5 мМ) для внесения в среду инкубации, в результате которой изучаемые клетки погибали с помощью апоптоза. Первый этап исследования заключался в оценке уровня сформированного окислительного стресса, реализации и регуляции апоптоза, особенностей реагирования компонентов тиолдисульфидной системы, окислительной модификации белков и их деградации в интактных опухолевых клетках и лимфоцитах крови, а также в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro*.

На втором этапе исследования, для оценки участия окислительной модификации белков, их деградации, компонентов тиолдисульфидной системы, Hsp27 и Hsp70 в механизмах дизрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии, клетки линии Jurkat культивировали в присутствии индуктора апоптоза дексаметазона и/или блокатора SH-групп пептидов и протеинов – N-этилмалеимида, протектора SH-групп пептидов и белков – 1,4-дитиоэритритола, ингибитора синтеза глутатиона *de novo* – бутионин-сульфоксимины или ингибитора Hsp27 – 5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазола.

Оценку реализации апоптоза, презентации на мембранах клеток CD5, TNF RI, Fas-рецепторов, количества клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, содержания активных форм кислорода проводили методом проточной лазерной цитофлуориметрии; концентрации белков NF-κB, Araf-1,

Hsp27, Hsp70, убиквитина и убиквитинлигазы определяли с помощью вестерн-блотт анализа. Уровень экспрессии матричной РНК гена убиквитина оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени; активности каспазы-3, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, тиоредоксинредуктазы, а также концентрацию общего белка, гидроксильного радикала, SH-групп белков, восстановленного, окисленного и белково-связанного глутатиона – спектрофотометрическим методом; содержание карбонильных производных белков определяли с помощью иммуоферментного анализа; концентрацию битирозина и окисленного триптофана – спектрофлуориметрическим методом. Результаты проведенного исследования подвергали статистической обработке.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. В интактных опухолевых клетках линии Jurkat дизрегуляция апоптоза опосредована дисбалансом тиолдисульфидной системы, сопровождающимся увеличением внутриклеточного содержания белков теплового шока 27 и 70, накоплением окислительно-модифицированных протеинов и активацией убиквитин-зависимого пути деградации белков. В лимфоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* (0,5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) нарушение состояния тиолдисульфидной системы сопровождается увеличением содержания белка теплового шока 27, накоплением окислительно-модифицированных протеинов, что приводит к активации запрограммированной гибели клеток.

2. Изменение редокс-статуса тиолдисульфидной системы в условиях восстановления и блокирования SH-групп пептидов и белков, ингибирования синтеза глутатиона *de novo* и белка теплового шока 27 приводит к активации обратимой и необратимой окислительной модификации протеинов, что сопровождается индукцией рецепторного и митохондриального путей апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.

3. Активация убиквитин-зависимой деградации белков опосредована изменением редокс-статуса опухолевых клеток линии Jurkat на фоне накопления карбонильных производных протеинов. В редокс-зависимом регулировании

уровня окислительно-модифицированных белков и активации убиквитин-зависимой дегградации протеинов участвуют белки теплового шока 27 и 70.

4. Редокс-зависимая регуляция апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat осуществляется с помощью глутатионилирования и убиквитинилирования протеинов при участии белков теплового шока 27 и 70.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением работы на достаточном экспериментальном и клиническом материале с использованием современных и высокотехнологичных молекулярно-биологических методов исследований. Полученные результаты статистически обработаны с помощью современных методов доказательной медицины.

Результаты проведенного исследования докладывались и обсуждались на Международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине» (г. Сочи, 2012), Международной научной конференции «Фундаментальные исследования» (Израиль, г. Тель Авив, 2012), 10th International Congress «Cell Volume Regulation: Novel Therapeutic Targets & Pharmacological Approaches» (г. Москва, 2013), научно-практической конференции с международным участием, посвященной памяти профессора Е.Ф. Ларина «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных функций в норме и при патологии» (г. Томск, 2013), Proceedings of the 2nd European Conference on Biology and Medical Sciences (Austria, Vienna, 2014), Международной научно-практической конференции «Современная наука: теоретический и практический взгляд» (г. Уфа, 2015), Международной научно-практической конференции «Достижения и проблемы современной науки» (г. Уфа, 2015), XLI заочной научной конференции «International Research Journal» (г. Екатеринбург, 2015), XXII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии-2016» (г. Санкт-Петербург, 2016).

Исследование поддержано грантами в рамках Федеральных целевых программ: «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития

научно-технического комплекса России на 2007-2013 годы» (проект «Разработка технологических основ защиты клеток при гипоксии с использованием идентификации редокс-зависимых молекулярных мишеней управления ион-транспортирующими системами» (ГК № 16.512.11.2282)); «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» (проект «Разработка технологических основ действия мишень-направленных биологически активных молекул для коррекции нарушений пролиферации и программированной гибели опухолевых клеток» (ГК № 8302)), а также Советом по грантам при Президенте Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ Российской Федерации в рамках проектов «Идентификация молекулярных мишеней регуляции апоптоза, пролиферации и дифференцировки клеток крови при патологии инфекционного и неинфекционного генеза» (Грант Президента Российской Федерации № 16.120.11.614-НШ), «Молекулярные механизмы нарушения апоптоза, пролиферации, дифференцировки и коммуникации клеток крови при социально-значимых заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы» (Грант Президента Российской Федерации № 14.120.14.4184-НШ).

Получены патенты Российской Федерации на изобретения: «Способ оценки эффективности стимуляции антиоксидантной активности» № 2516925 от 04.04.2013 г. (Канская Н.В., Степовая Е.А., Федорова Н.А., Носарева О.Л., Позднякова И.А., Канский А.В., Твердохлебов С.И.), «Способ прогнозирования эффективности защиты лимфоцитов от перекисления» № 2525183 от 07.05.2013 г. (Канская Н.В., Степовая Е.А., Федорова Н.А., Носарева О.Л., Позднякова И.А., Канский А.В., Твердохлебов С.И.), «Способ защиты клеток от апоптоза» № 2541774 от 07.05.2013 г. (Канская Н.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л., Позднякова И.А., Федорова Н.А., Твердохлебов С.И., Канский А.В.).

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедр патофизиологии (раздел «Патофизиология, клиническая

патофизиология»), биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики (раздел «Молекулярная биология»); в научно-исследовательском процессе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (с 01.07.2016 г. ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 38 работ, из них 17 статей – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации, 6 – цитируемых в Web of Science, 6 – цитируемых в Scopus, а также 3 патента Российской Федерации на изобретения.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 235 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 513 источников – 66 отечественных и 447 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 20 таблицами.

**Личный вклад автора.** Автором проведено планирование и разработка дизайна исследования, сформулированы цель и задачи исследования, выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, отражающей современное состояние исследований по данной научной проблеме, определен методологический подход, позволяющий наиболее полно решить поставленные в исследовании задачи, самостоятельно выполнен весь комплекс запланированных методов, проведена статистическая обработка данных, интерпретация результатов исследования и подготовка их к публикации.

## **Глава 1. Обзор литературы. Современные представления о роли редокс-баланса, окислительной модификации белков и их деградации в дизрегуляции апоптоза при опухолевом росте**

### **1.1 Современные представления о молекулярных механизмах реализации апоптоза при опухолевом росте**

Апоптоз представляет собой активную форму гибели клеток, физиологический механизм устранения функционально неполноценных, дефектных по рецепторному представительству клеток. Феномен развития апоптоза является следствием воздействия различных факторов, приводящих к гибели клетки [3, 32, 49, 66, 172, 250]. Различают фазу инициации, развития апоптоза или эффекторную фазу и фазу деградации, в результате которой происходит гидролиз белковых молекул клетки, ДНК и полная реорганизация цитоскелета. В настоящее время принято различать мембранные, митохондриальные и ядерные механизмы индукции апоптоза. Развитие эффекторной фазы процесса зависит от механизма инициации трансдукции сигнала: внешний – рецептор-зависимый сигнальный путь (суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF), TNF-рецепторов I (tumor necrosis factor receptor I type, TNF RI)) и внутренний – митохондриальный путь гибели клетки [12, 49, 144]. Дизрегуляция танатогенной программы клеток приводит к патологическим изменениям органов и тканей с нарушением их функций. Активация или ингибирование апоптоза лежит в основе патогенеза таких социально-значимых заболеваний как онкологические, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, эндокринные, воспалительные процессы инфекционного и неинфекционного генеза и т.д. [23, 45, 60, 389, 480]. Так, дисбаланс про- и антиапоптогенных факторов, приводящий к ингибированию запрограммированной гибели, является главной причиной опухолевой трансформации нормальных клеток и малигнизации доброкачественных опухолей.

В 2013 г. в России в общей структуре смертности онкологическая патология составляла 24,10 %, являясь второй причиной смерти после сердечно-сосудистых заболеваний. По Сибирскому федеральному округу среднегодовой темп прироста возникновения гемобластозов с 2003 по 2013 год составил 2,17 %. На сегодняшний день Томская область находится на втором месте в России по возникновению злокачественных новообразований лимфатической и кроветворной ткани (15,72 случая на 100 тыс. населения), а в младших (0-29 лет) возрастных группах доминирует смертность именно при этой локализации новообразований (30,30 %) [21]. В связи с этим большой интерес представляет поиск молекулярных мишеней нарушений реализации апоптоза с целью разработки диагностических маркеров опухолей и таргетной терапии злокачественных новообразований, в том числе гемобластозов. Выяснение молекулярных механизмов осуществления генетического контроля и модулирования апоптотического процесса необходимо для понимания патогенеза онкологических заболеваний с целью поиска высокоспецифичных инновационных подходов к лечению рака.

### **1.1.1 Молекулярные особенности реализации программированной гибели клетки по рецепторному пути**

Рецепторы семейства TNF (Fas/APO-1 (cluster of differentiation, CD95), TNF RI (CD120), DR3 (death receptor)/WS-1, DR4/TRAIL-R1 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), DR5/TRAIL-R2 и DR6 относят к мембранным белкам I типа, имеющих гомологичное строение в экстрацеллюлярных доменах [479]. Большинство рецепторов этого суперсемейства имеет растворимые формы соответствующих лигандов. Реализация апоптогенного сигнала возможна, благодаря наличию С-концевого внутриклеточного домена смерти (death domain, DD), домена эффектора смерти (death-effector domain, DED), домена активации и

рекрутирования каспаз в клетках (caspase activation and recruitment domain, CARD) [147, 158, 269, 461].

Fas-рецептор конститутивно экспрессируется на поверхности активированных Т- и В-лимфоцитах, тимоцитов, фибробластах, гепатоцитах, кератиноцитах, миелоидных клетках [4]. Комплекс Fas-рецептор/Fas-лиганд через домены смерти участвует во взаимодействии с адаптером Fas-ассоциированного домена смерти (Fas-associated DD-protein, FADD). N-терминальный участок адаптера FADD содержит DED, участвующий в образовании смерть-индуцирующего сигнального комплекса (death-inducing signaling complex, DISC). Домены DED участвуют во взаимодействии адаптера FADD с прокаспазами-8 и -10, иницируя их путем олигомеризации, приводящей к аутокатализу ферментов каскада. Активация иницирующей каспазы-8 приводит к срабатыванию эффекторных каспаз (каспаза-3, -6, -7), реализующих гидролитическую деградацию макромолекул клетки [147, 158, 269]. Кроме этого, домены DED участвуют в связывании клеточного ингибитора протеинов (cellular FADD-like interleukin-1 $\beta$  converting enzyme inhibitory protein, c-FLIP), тем самым реализуя цитопротективный эффект (рисунок 1) [147, 269, 389, 407, 501].

A. Ashkenazi и V.M. Dixit (1998) выявили, что, помимо FADD адаптера, сродством к DD-домену Fas-рецептора обладает цитоплазматический адаптерный фактор Daхх, который иницирует FADD-независимый SAPK/c-Jun N-terminal kinase (JNK)/p38-путь активации протеинкиназ и факторов транскрипции c-Jun [94].

Но, в настоящее время установлено, что клетки крови и некоторые опухолевые клеточные линии, в результате изменения транскрипции участка кодирования Fas-рецептора, имеют Fas-растворимый антиген, мономерные формы которого блокируют центры связывания для Fas-лиганда, делая их недоступными для мембранного CD95-антигена, в результате чего апоптоз не иницируется [4].

Известно, что Fas-рецептор содержит три повтора аминокислотных последовательностей, богатых цистеином, что может представлять собой один из

молекулярных редокс-зависимых механизмов воздействия на степень окисления SH-групп и его функциональное состояние [304].

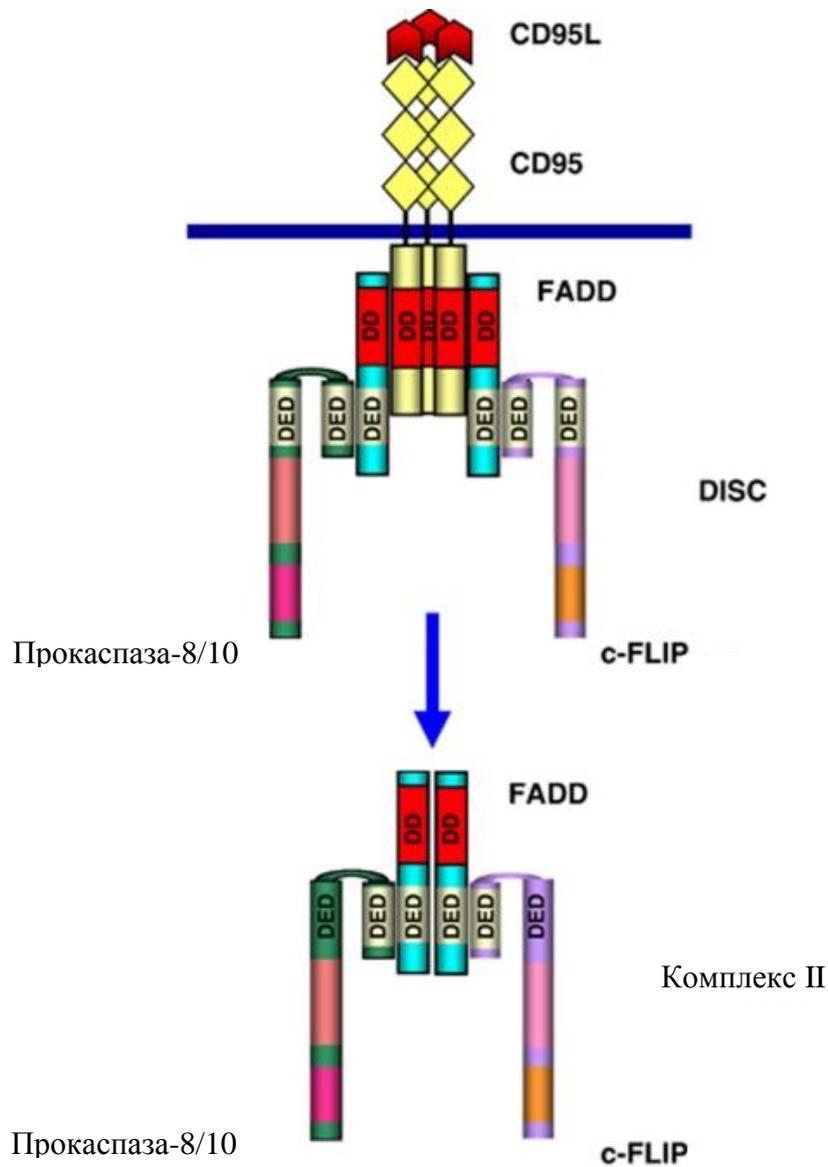


Рисунок 1 – Каскад внутриклеточных событий в результате взаимодействия Fas-лиганда с Fas-рецептором (по данным [269])

Примечание – CD95L (cluster of differentiation, поверхностный кластер дифференцировки) – CD95-лиганд, CD95 – CD95-рецептор, DD (death domain) – внутриклеточный домен смерти, DED (death-effector domain) – домен эффектора смерти, FADD (Fas-associated DD-protein) – Fas-ассоциированный домен смерти, DISC (death-inducing signaling complex) – смерть-индуцирующий сигнальный комплекс, c-FLIP (cellular FADD-like interleukin-1 $\beta$  converting enzyme inhibitory protein) – клеточный ингибитор протеинов

TNF RI после связывания с лигандом подвергается олигомеризации. Передача апоптоз-активирующего сигнала происходит с помощью адаптерного белка, ассоциированного с доменом смерти (TNF RI-associated death domain, TRADD) на FADD и затем на прокаспазу-8, как и в случае активации Fas-рецептора (рисунок 2) [64, 158, 200, 270, 407].

В строении TNF RI различают три функциональные области, которые при взаимодействии с различными внутриклеточными адаптерными белками передают апоптоз-индуцирующие сигналы внутрь клетки. Выделяют С-терминальный участок рецептора, ассоциированный с DED, средний участок, содержащий кислый сфингомиелин-активирующий домен (acidic sphingomyelinase-activated domain, A-SMase), и N-терминальный участок, содержащий нейтральный сфингомиелин-активирующий домен (neutral sphingomyelinase-activated domain, N-SMase). Установлено, что активация TNF RI может приводить к переключению апоптоз-активирующего сигнала на реализацию запрограммированной гибели клетки по митохондриальному пути [4, 460, 498].

К ключевым механизмам реализации рецептор-индуцированного апоптоза относят активацию каспазного каскада ферментов [12, 53, 88, 122, 185, 201]. Каспазы – цистеиновые протеазы, проявляющие относительную субстратную специфичность к пептидной связи, в формировании которой принимает участие остаток аспарагиновой кислоты [61, 414]. Различают инициаторные (-2, -8, -9, -10, -12) и эффекторные (-3, -6, -7) каспазы. Последние катализируют гидролитическое расщепление белков из семейства В-клеток лейкемии-2 (Bcl-2).

Субстратом каспазы-8 является прокаспаза-3. Каспаза-3, способная к аутокатализу, активирует ряд других протеаз семейства каспаз. К субстратам протеаз относятся белки цитоскелета (ламин, гельзолин, актин, фордин), факторы транскрипции, регуляторы ДНК-репликации, топоизомераза II, гистон H1, а также белки, отвечающие за сплайсинг матричной РНК (мРНК). Кроме этого, эти протеазы расщепляют ферменты репарации ДНК и активируют  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -

зависимую эндонуклеазу, что ведет к необратимому распаду ДНК. Считается, что после активации каспазы-3 процесс апоптоза оказывается необратимым [61].

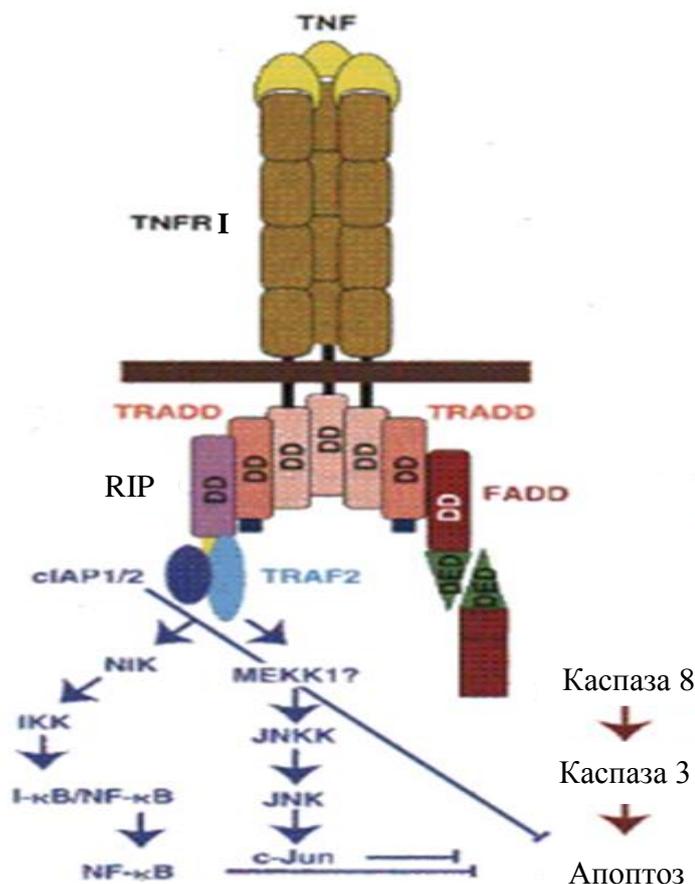


Рисунок 2 – Каскад внутриклеточных событий в результате взаимодействия TNF RI-лиганда с TNF RI (по данным [158, 479])

Примечание – TNF – tumor necrosis factor, лиганд фактора некроза опухоли, TNF RI – TNF-рецептор I, DD (death domain) – внутриклеточный домен смерти, DED (death-effector domain) – домен эффектора смерти, TRADD (TNF RI-associated death domain) – адаптерный белок, ассоциированный с доменом смерти, FADD (Fas-associated DD-protein) – Fas-ассоциированный домен смерти, RIP (receptor interacting proteins) – адаптерный белок, cIAP 1/2 (cellular inhibitor of apoptosis proteins 1/2) – клеточный ингибитор апоптоз-специфических протеаз 1/2, TRAF 2 (TNF-receptor-associated factors 2) – фактор 2, ассоциированный с TNF-рецептором, NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – транскрипционный ядерный фактор κB, NIK (NF-κB inducing kinase) – NF-κB индуцирующая киназа, I-κB (inhibitor κBα) – ингибиторный белок κB, IKK (I-κB kinase) – комплекс ингибиторных киназ, MEKK1 (mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase 1) – митоген-активируемая внеклеточная сигнальная протеинкиназа 1, JNKK (c-Jun N-terminal kinase kinase) – киназа c-Jun N-терминальной киназы, JNK (c-Jun N-terminal kinase) – c-Jun N-терминальная киназа; **—|** – ингибирующий эффект, **→** – активирующий эффект

Прочие представители семейства каспаз (каспаза-1, -4, -5, -11, -13) в апоптозе не участвуют, а являются участниками развития воспалительных процессов, а также, наряду с эффекторными каспазами, пролиферации Т-лимфоцитов, терминальной дифференцировки эпителиальных клеток хрусталика и кератиноцитов [12, 185]. Каспазы-3, -7 и -10 активируются с помощью сериновой протеазы – гранзима В. [53, 176, 202]. Таким образом, активация каспаз вызывает деструкцию клеточных структур и дисбаланс метаболических процессов, поддерживающих при физиологических условиях гомеостаз клетки.

Регуляция апоптоза происходит с участием различных внутриклеточных сигнальных компонентов и путем изменения скорости синтеза различных про- и антиапоптогенных факторов. Действия каспаз модулируются семейством протеинов, обладающих ингибирующим влиянием на апоптоз-специфические протеазы (inhibitor of apoptosis proteins, IAP) – cIAP-1, cIAP-2, XIAP, Survin и BRUCE [138, 174, 244, 253, 395]. Установлено, что XIAP, cIAP-1 и cIAP-2 ингибируют протеазную активность каспазы-9, а также протеолитическую активацию каспазы-3 и -7, тем самым, предотвращая инициацию каспазного каскада. c-FLIP, связываясь с каспазой-8 в области сигнального комплекса, предупреждают активацию каспазного каскада в ответ на взаимодействие Fas-лиганда [89, 121, 295, 412, 428, 509]. Установлено, что белок NAIP ингибирует каспазы-1, -3, -6, -7 и -8 [166].

### **1.1.2 Молекулярные особенности реализации программированной гибели клетки по митохондриальному пути**

Важнейшие элементы сигналпередающих путей индукции апоптоза находятся в митохондриях. Эти органеллы, с одной стороны, могут выступать в качестве мишеней регуляторных апоптогенных молекул, с другой, – как источники генерации активных форм кислорода (АФК), являющихся

неотъемлемой частью каскада реализации запрограммированной гибели клетки в качестве сигнальных молекул наряду  $\text{Ca}^{2+}$ . Митохондриальный путь реализации программы клеточной гибели включает действие про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2, изменение свойств кардиолипина, сопровождающееся выходом апоптогенных факторов в цитозоль клетки (цитохром С, apoptosis inducing factor (AIF), apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1), second mitochondria derived activator of caspases (Smac)/ direct inhibitor of apoptosis proteins binding protein with low pI (DIABLO)) и снижением электрохимического потенциала ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) [101, 108, 148, 196, 277, 333, 343, 388, 509]. Снижение  $\Delta\mu\text{H}^+$  влечет за собой нарушение окислительного фосфорилирования, следствием чего является генерация АФК, а также недостаток синтеза АТФ и возникновение гипоэнергетического состояния клетки.

Среди белков семейства Bcl-2 различают группу апоптоз-опосредующих факторов (Bax, Bad, Bak, Bik, Bid, Bcl-xs и др.), которые выполняют функцию защиты клеток от апоптоза [81, 388]. Индуктором транскрипции генов, кодирующих информацию о белках-IAP, а также экспрессии антиапоптотических белков семейства Bcl-2, является транскрипционный ядерный фактор  $\kappa\text{B}$  (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa\text{B}$ ). NF- $\kappa\text{B}$  представляет собой семейство из пяти белков: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- $\kappa\text{B1}$ ) и p52/p100 (NF- $\kappa\text{B2}$ ), которые в нестимулированных клетках в виде гомо- и гетеродимеров находятся в неактивном состоянии из-за связи с цитозольным ингибиторным белком  $\kappa\text{B}\alpha$  (inhibitor  $\kappa\text{B}\alpha$ , I- $\kappa\text{B}\alpha$ ). Активирование NF- $\kappa\text{B}$  происходит путем фосфорилирования I- $\kappa\text{B}\alpha$  комплексом киназ (I- $\kappa\text{B}$  kinase, IKK), который состоит из нескольких субъединиц: IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  и IKK $\gamma$ /NEMO (NF- $\kappa\text{B}$  essential modulator). Комплекс IKK активируется комплексом TRAF2 (TNF-receptor-associated factors 2)/RIP1 (receptor interacting proteins 1) при участии митоген-активируемой (mitogen-activated protein kinase, MAP) и внеклеточной сигнальной протеинкиназы (extracellular signal-regulated protein kinase 3, ERK 3) – MEKK3 [249].

Таким образом, находящиеся под контролем NF-κB участки генома (*FLIP*, *Bcl-X<sub>L</sub>*, *TRAF*, *cIAP*) активируются и происходит наработка мРНК. В свою очередь, продукты трансляции мРНК гена *cIAP* – белки, способны связываться с *TRAF*, что рассматривается как альтернативный путь TNF RI-опосредованной активации NF-κB по принципу положительной обратной связи. Следовательно, повышенная экспрессия *cIAP* способна предотвращать TNF-индуцированную гибель клеток. Ингибирующим эффектом на IAP-белки обладает комплекс Smac/DIABLO, который выходит из митохондрий при активации митохондриального пути апоптоза [492].

В активации NF-κB может принимать участие Hsp90. Этот шаперон способен стабилизировать адаптерный белок RIP и, тем самым, препятствовать его деградации. Также, мишенью Hsp90 может служить киназный домен комплекса IKK [23, 258].

Помимо этого, в настоящее время активно обсуждается участие глутатионилирования и убиквитинилирования в процессе активации факторов транскрипции, в том числе и NF-κB [265, 294, 359, 501].

Триггерным фактором апоптотической гибели клетки по митохондриальному пути является формирование апоптосомы путем АТФ-зависимой олигомеризации цитохрома С и Araf-1, которая затем связывается с прокаспазой-9 по специфическому CARD-домену в составе адаптерного белка. Это приводит к активации каспазы-9, которая, в свою очередь, активирует эффекторную каспазу-3. С другой стороны, к стимуляции каскада активации цистеин-зависимых протеаз через каспазу-3 приводит высвобождение AIF [87, 177].

Кроме этого, установлено, что в активации каспазы-3 может принимать участие митохондриальная АТФ-зависимая сериновая протеаза 2 – HtrA2 [149].

На сегодняшний день является доказанным факт интеграции между митохондриальным и рецепторным путем запуска апоптоза (рисунок 3).

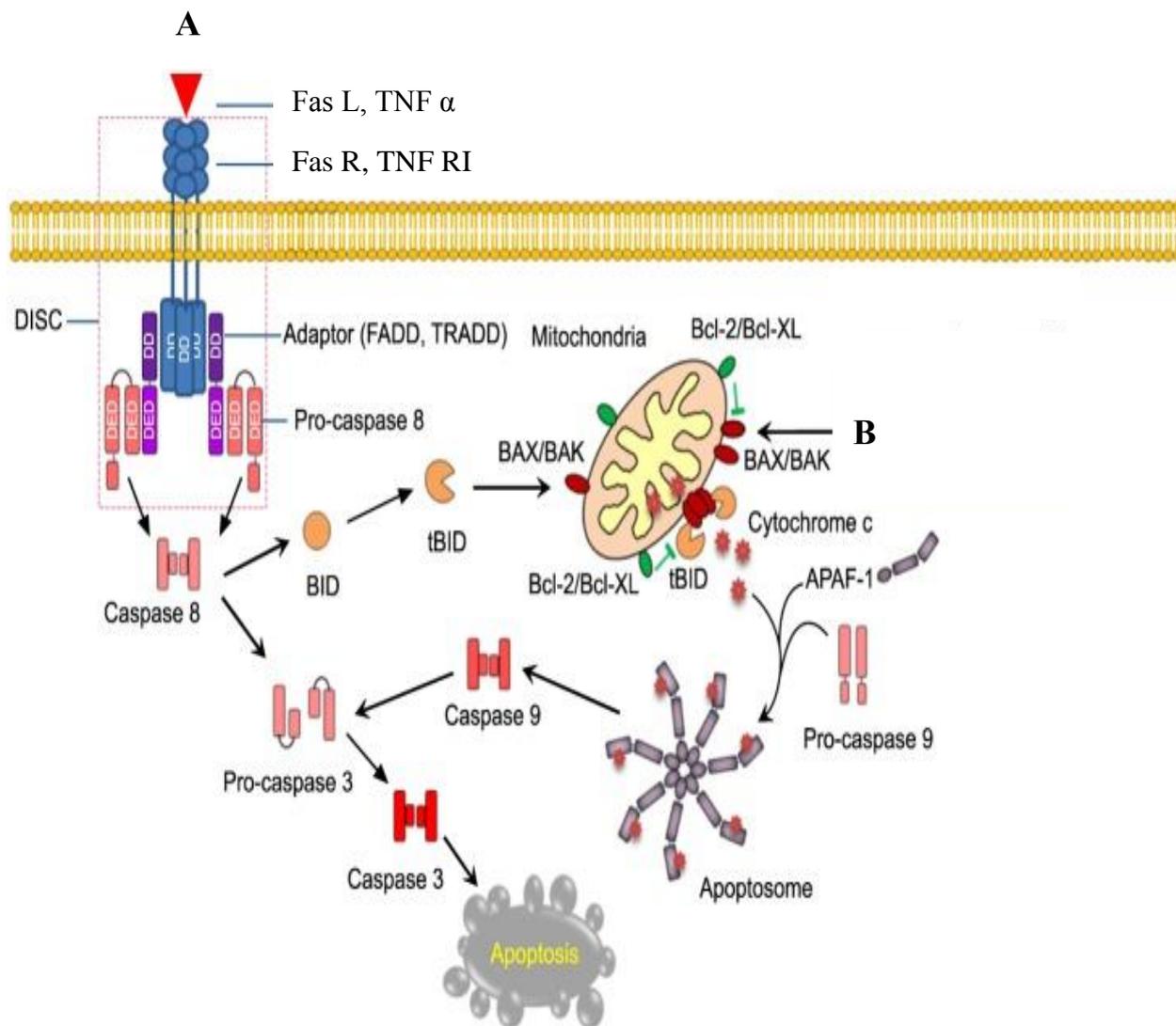


Рисунок 3 – Схема интеграции передачи рецептор-опосредованного (А) и митохондриального сигналов (В) апоптоза (по данным [88, 479])

Примечание – Fas L, TNF- $\alpha$  – апоптоз-индуцирующие лиганды, Fas R, TNF RI – апоптоз-индуцирующие рецепторы, DISC (death-inducing signaling complex) – смерть-индуцирующий сигнальный комплекс, Adaptor (FADD, TRADD) – адаптерный белок, ассоциированный с FADD (Fas-associated DD-protein) – Fas-ассоциированный домен смерти и TRADD (TNF RI-associated death domain) – адаптерный белок, ассоциированный с доменом смерти, DD (death domain) – внутриклеточный домен смерти, DED (death-effector domain) – домен эффектора смерти, Mitochondria – митохондрия, Pro-caspase 8 – прокаспаза 8, Caspase 8 – каспаза 8, Pro-caspase 3 – прокаспаза 3, Caspase 3 – каспаза 3, Pro-caspase 9 – прокаспаза 9, Caspase 9 – каспаза 9, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, BID, BAX, BAK – белки семейства Bcl-2, tBID – активная форма белка BID, Cytochrome c – цитохром С, APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1) – фактор активации протеаз-1, Apoptosome – апоптосома, Apoptosis – апоптоз

В частности, установлено вовлечение митохондрий в Fas-индуцированный апоптоз за счет ограниченного протеолиза белка Bid, активная форма которого (tBid) способствует встраиванию в митохондриальную мембрану проапоптозного протеина Bax. Bax, взаимодействуя с порообразующим белком – порином, образует канал, с помощью которого в цитоплазму выходит цитохром С и AIF [426]. Кроме этого, митохондрии являются источниками АФК, которые выступают не только в роли вторичных мессенджеров для запуска внутриклеточных апоптоз-реализующих механизмов, но и как молекулы, изменяющие степень окисления тиоловых групп мембранных белков [163]. Это приводит к образованию дисульфидных мостиков, что, в свою очередь, вызывает изменение конформации мембранных белков клетки, происходит открытие пор в мембране, набухание митохондрий, повреждение их наружной мембраны, выход в цитоплазму цитохрома С и AIF.

Таким образом, апоптоз является важным регулятором функциональной способности клеток, основным физиологическим способом удаления поврежденных клеток, что рассматривается как один из механизмов генетического контроля гомеостаза организма. Дизрегуляция апоптоза клеток может приводить к возникновению опухолевой прогрессии.

## **1.2 Современные представления о молекулярных механизмах формирования окислительного стресса в клетке при опухолевом росте**

Окислительный стресс (ОС) характеризуется повышенной внутриклеточной генерацией АФК и является универсальным механизмом повреждения клетки. Формирование ОС, сопряженное с несостоятельностью системы антиоксидантной защиты клетки, наряду с дизрегуляцией апоптоза, лежит в основе развития многих социально-значимых заболеваний (онкологические, сердечно-сосудистые, нейро-дегенеративные и др.).

### 1.2.1 Роль активных форм кислорода в развитии окислительного стресса

Под АФК принято понимать разные по химической структуре соединения: пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), свободные радикалы ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{HO}^\bullet_2$ ), ион-радикалы ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ), гипогалоиды ( $\text{HOCl}$ ,  $\text{HOBr}$ ,  $\text{HOI}$ ), пероксильный (алкилдиоксил) ( $\text{RO}^\bullet_2$ ) и алоксильный ( $\text{RO}^\bullet$ ) радикалы, оксид азота ( $\text{NO}^\bullet$ ), пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ), обладающие высокой реакционной способностью [17, 40, 47, 175, 357, 366, 487, 491].

Основные механизмы внутриклеточной генерации АФК в лимфоцитах связаны с нарушениями передачи электронов по транспортным цепям митохондрий или микросом, а также изменение активности оксидаз, монооксигеназ и дегидрогеназ [1, 38, 267, 413]. В процессе присоединения электрона к молекуле кислорода в первую очередь образуется супероксидный анион-радикал –  $\text{O}_2^{\bullet-}$  [18, 40, 203, 430, 491]. Основное генерирование  $\text{O}_2^{\bullet-}$  происходит при сбоях в цепи переноса электронов митохондрий и микросомах лимфоцита в условиях недостатка  $\text{O}_2$  за счет функционирования коэнзима Q, микросомальных монооксигеназ, ксантиноксидазы и др. [18, 40, 305].

$\text{O}_2^{\bullet-}$  обладает окислительно-восстановительными свойствами и сравнительно малой реакционной способностью. В настоящее время показано, что транспорт через плазматическую мембрану внутриклеточного  $\text{O}_2^{\bullet-}$  возможен только при помощи анионных переносчиков [72]. Большую повреждающую опасность для макромолекул представляют продукты его метаболизма ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\bullet$  и др.).  $\text{O}_2^{\bullet-}$  быстро утилизируется супероксиддисмутазой в реакции:



Пероксид водорода относится к окислителям средней силы, способным взаимодействовать с веществами радикальной и нерадикальной природы. Пероксид водорода, являясь электростатически нейтральной и гидрофобной молекулой легко покидает клетку [20]. В противном случае он атакуется

каталазой или селензависимой глутатионпероксидазой (ГПО) [76, 120] и превращается в воду.

При недостатке супероксиддисмутазы, в присутствии ионов металлов переменной валентности, может протекать спонтанная дисмутация супероксида. Она сопровождается появлением синглетного кислорода в качестве побочного продукта. Синглетный кислород способен атаковать биологические молекулы в области двойных связей. Исходя из этого, эта молекула активно участвует в окислительно-восстановительных реакциях, повреждая белки, липиды и нуклеиновые кислоты [17, 312, 486]. Пероксид водорода может выступать в качестве окислителя лишь при миллимолярных концентрациях, по-видимому, являющихся нефизиологическими. Однако, при недостатке активности каталазы и пероксидаз при ОС возникает возможность повреждения макромолекул вследствие повышенной способности пероксида водорода к образованию высокоактивного и токсичного гидроксил-радикала в присутствии ионов металлов переменной валентности ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) (реакция Фентона) [171, 182, 203, 468, 491]:



В реакции, кроме  $\text{OH}^\bullet$ , могут образоваться и другие радикальные продукты. Гидроксильный радикал представляет собой один из наиболее реакционно-способных окислителей, поэтому он способен реагировать почти с любой молекулой в клетке в радиусе своего действия [9, 63, 203]. Он вызывает разрыв цепей в ДНК, химическую модификацию дезоксирибозы и азотистых оснований, окисляет молекулы белков, углеводов и липидов. Гидроксильный радикал особенно активно взаимодействует с теми липидами, жирнокислотные радикалы которых содержат ненасыщенные двойные связи. Это приводит к образованию липидных гидроперекисей в ходе цепных реакций [115, 491].

При участии  $\text{OH}^\bullet$  происходит генерация радикальных соединений белков с помощью тирозиновых, триптофановых, гистидиновых, фенилаланиновых аминокислотных остатков [17, 482].

Пероксид водорода может приводить к образованию гидроксильного радикала и при взаимодействии с супероксид-анионом (реакция Хабер-Вейса):



Реакция также катализируется металлами переменной валентности [115]. Таким образом, если клетка не содержит подобных металлов в свободном состоянии, ни реакция Фентона, ни реакция Хабер-Вейса не будут для нее особенно опасными [40, 182, 203].

Еще одной свободно-радикальной формой, ферментативно вырабатываемой в клетках, является оксид азота, короткоживущий свободный радикал с высокой реакционной способностью [453]. Его рассматривают как вторичный мессенджер, участвующий в регуляции ряда физиологических функций, в том числе пролиферации, дифференцировке и запуске апоптоза клеток [41, 401, 491]. Оксид азота образуется при действии NO-синтазы. Есть два основных типа фермента: конститутивная форма (обнаружена в основном в нейронах и эндотелиальных клетках) и индуцибельная форма [6, 44, 325, 453]. При взаимодействии с низкомолекулярными тиолами,  $\text{NO}^\bullet$  способен образовывать моно- и динитрозильные комплексы, являющиеся токсичными для клетки. Мононитрозоглутатион и динитрозильные комплексы взаимодействуют с SH-содержащими белками, а также могут вызывать гибель клетки [2, 41, 415].

Взаимодействуя с супероксид-анионом,  $\text{NO}^\bullet$  может образовывать нерадикальное соединение - пероксинитрит. В 1989 г. В. Halliwell предположил, что эта реакция обеспечивает тонкий контроль тонуса сосудистой стенки [205]. Несмотря на свою нерадикальную природу, пероксинитрит не является нейтральным соединением. Токсичность пероксинитрита проявляется в том, что в своей ионизированной форме он окисляет SH-группы регуляторных белков и пептидов, а его производное  $\text{NO}^\bullet$  осуществляет нитрование тирозиновых групп белков, выводя их из-под контроля тирозиновых киназ, что приводит клетку к апоптозу [19, 20, 326, 487].

Таким образом, из-за высокой реакционной способности АФК способны повреждать различные макромолекулы, в первую очередь белки. В последнее время тиолсодержащие сенсоры рассматриваются в качестве потенциальных редокс-сигнальных модулей [155, 190, 195, 296]. Накопленные данные свидетельствуют о том, что высокие скорости взаимодействия сенсорных молекул с АФК обеспечиваются наличием сайтов связывания, которые содержат функционально-активный остаток молекулы, способный прямо реагировать с окисляющим агентом. В белках роль редокс-сигнализации выполняют цистеиновые остатки аминокислот. При взаимодействии с активированными кислородными метаболитами последние могут подвергаться окислению в цистеинсульфеновую, цистеинсульфиновую и цистеинсульфоновую кислоты, тем самым изменяя конформацию и активность белков [19, 84]. Редокс-статус тиоловых групп в составе молекул белков в клетках играет важную роль в их фолдинге и функциональной активности.

### **1.2.2 Молекулярные механизмы окислительной модификации белков, их деградации и рефолдинга при окислительном стрессе**

В настоящее время актуальным направлением медико-биологической науки является изучение изменения функционирования молекулярных систем в результате конформационных изменений белковых молекул. Основными индукторами окислительной модификации белков (ОМБ) в настоящее время рассматриваются АФК, ионы переменной валентности, продукты пероксидации липидов, углеродсодержащие карбонильные компоненты (малоновый альдегид, кетоальдегиды, 4-гидрокси-2-ноненали и др.) [85, 182, 345, 357, 365]. Особенности строения белковых молекул позволяют считать их основными ловушками АФК. Наличие в составе полипептидной цепи серосодержащих и

ароматических аминокислот позволяет активно улавливать определенные молекулы АФК [17, 365].

В настоящее время известны три механизма развития ОМБ:

- 1) реакция конъюгации липидных гидроперекисей с аминокислотными радикалами гистидина, цистеина и лизина в белках [436];
- 2) реакция окисления аминокислотных радикалов с помощью АФК [43, 365];
- 3) реакция гликозилирования и гликооксидации аминокислотных радикалов лизина и аспарагина [43, 271, 404].

Акцепторами электронов могут являться заряженные карбоксильные группы, аминогруппы, ароматические радикалы аминокислот, сульфгидрильные и амидные группы [17, 22, 365].

Окислительное повреждение протеинов сопряжено с образованием нескольких типов радикалов аминокислотных остатков и полипептидного скелета белковой молекулы:

- 1) углеродные радикалы аминокислот, расположенные в глубине белковой молекулы;
- 2) перокси-радикалы аминокислот;
- 3) алкокси-радикалы аминокислот;
- 4) тиольные радикалы аминокислот;
- 5) азотистые радикалы аминокислот;
- 6) ароматические радикалы аминокислот [387, 417].

В настоящее время установлено, что в образовании «радикального центра» повреждаемой полипептидной цепи, которое сопряжено с фрагментацией белка, ведущую роль играет взаимодействие гидроксильного радикала и  $\alpha$ -углеродного атома аминокислотного остова. При этом супероксидный анион-радикал способствует образованию амидов и карбонильных производных белков (рисунок 4). Эти производные являются стабильными продуктами и формируются путем

ковалентной модификации с участием аминокислотных радикалов пролина, аргинина, лизина, треонина, цистеина и гистидина [337].

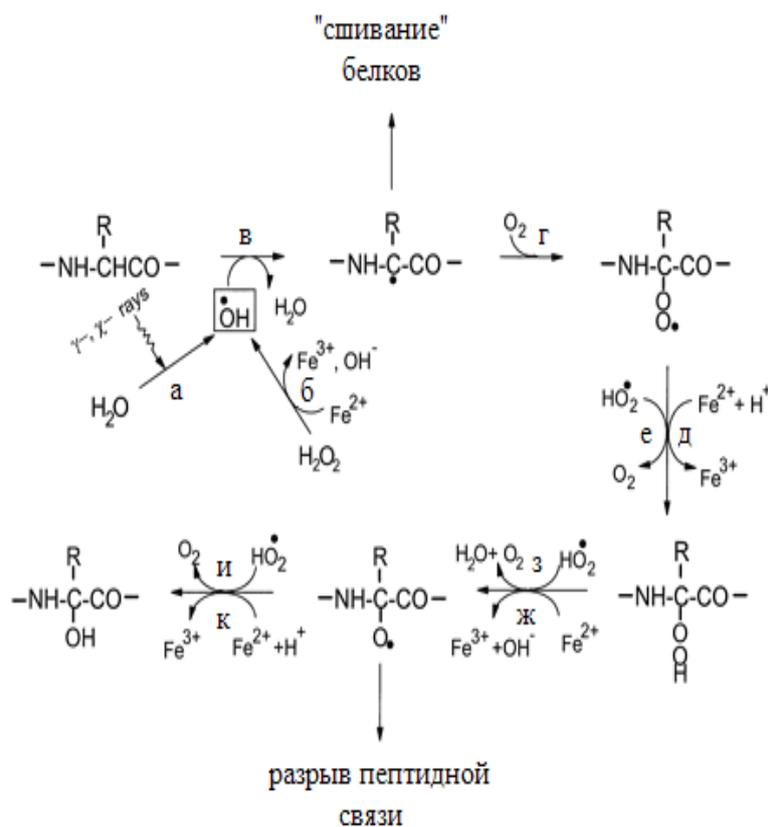


Рисунок 4 – Участие активных форм кислорода и ионов металлов переменной валентности в окислении полипептидной цепи (по данным [103])

Примечание – а, б) окислительная атака полипептидной цепи с помощью  $\text{OH}^\bullet$ ; в) образование углеродного радикального центра полипептидной цепи; г) реакция карбонильного радикала белка и  $\text{O}_2$  с последующим образованием алкилперокси-радикала полипептидной цепи; д) реакция образования алкилпероксида; ж, к) участие ионов металлов переменной валентности в формировании разрыва полипептидной цепи; з) реакция образования алкоксирадикала; и) реакция образования гидроксил-производных белков

Карбонилирование аминокислотных остатков в белках (т.е. модификация на уровне первичной структуры) приводит к последующим более существенным изменениям белковой молекулы (рисунок 5). Это проявляется в агрегации и фрагментации полипептидных цепей, подвергнутых воздействию АФК.

Следствием таких структурных повреждений является, в частности, резкое повышение чувствительности белков к протеолитической деградации протеазами и потеря их функциональной активности [17, 363]. В настоящее время установлено, что в карбонилировании белков участвует производное перекисного окисления липидов – акролеин, при этом в процесс вовлекается в основном лизин полипептидной цепи [345, 346, 357].

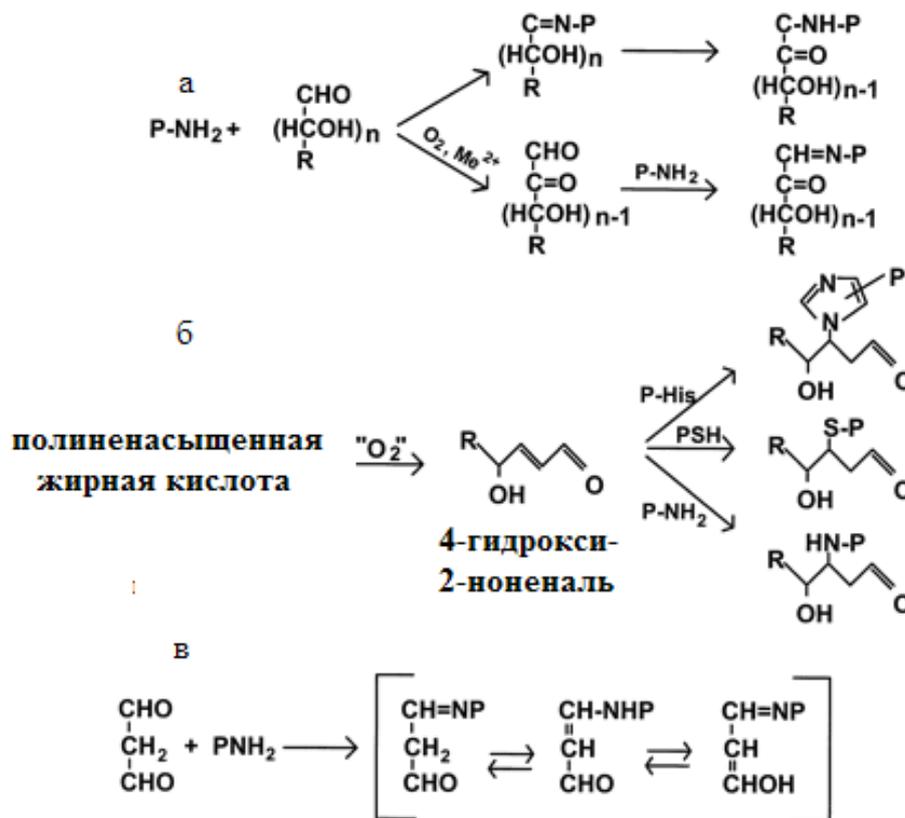


Рисунок 5 – Механизм образования карбонильных производных белков в реакциях гликозилирования (а), гликооксидации (а) и в реакциях с продуктами перекисного окисления липидов (б, в) (по данным [404, 436])

Примечание – остатки лизина – P-NH<sub>2</sub>, гистидина – P-His, цистеина – PSH, аминогрупп белков – PNH<sub>2</sub> в белках

Процесс карбонилирования белков напрямую связан со снижением функциональной активности шаперонов [43]. В основе механизма узнавания модифицированных белков с целью деградации лежит взаимодействие с 20S и 26S субъединицами протеасом, причем, первая взаимодействует через гидрофобные радикалы аминокислот белков с нарушенной конформацией, а

вторая – с помощью распознавания участков полипептидной цепи, конъюгированных с убиквитином [43, 62, 127].

Отдельно следует выделить обратимую окислительную модификацию полипептидной цепи при участии глутатиона, которая формируется при помощи слабых внутри- и межмолекулярных ковалентных связей с сульфгидрильной группой цистеина (глутатионилирование). Глутатион и сопряженные с ним ферментативные редокс-белки тиолдисульфидной системы (перокси-, глута-, тиоредоксины) обеспечивают процесс S-тиоляции/детиоляции активных центров протеинов, защищая их от необратимой окислительной модификации и инактивации [13, 74, 192, 316, 349, 424], что способствует поддержанию функциональной активности белков и клеток в целом. Кроме этого, SH-содержащие аминокислотные остатки цистеина и метионина в полипептиде являются мишенью для атаки АФК. Это обусловлено низкой степенью ионизации атома серы в цистеиновых радикалах аминокислот [19].

Рядом авторов показана роль окисленного глутатиона и его синтезированных аналогов в изменении активности очищенных ферментов и рецепторов путем глутатионилирования: карбоангидразы [114], альдозоредуктазы [435],  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы [385], трансактивации (лиганд-независимая активация) рецептора эпидермального фактора роста (epidermal growth factor, EGF) [59], MAP-киназ клеток [42].

В последнее время активно изучается процесс убиквитинилирования модифицированных белков с дальнейшей деградацией полученных продуктов на протеасомах (рисунок 6). Сигналом для протеасомальной деградации протеина является полиубиквитинилирование белковой молекулы с помощью убиквитинлигазы, что требует адекватной продукции АТФ митохондриями [62, 183, 379].

Убиквитин (лат. ubiquitous – повсеместный) – это высококонсервативный, термостабильный, глобулярный белок с молекулярной массой 8 kDa, состоящий из 76 аминокислот [199, 282, 466, 507]. В реакции убиквитинилирования

участвует Гли<sup>76</sup> – С-конца убиквитина и лизин в положениях 11, 29, 48 и 63 полипептидной цепи субстрата. Причем, в процессе деградации на 26S протеасомы участвуют субстраты, меченные полиубиквитином по Лиз<sup>48</sup> и Лиз<sup>29</sup>, а присоединение убиквитина по Лиз<sup>63</sup> белка-мишени является модификацией, которая влечет за собой изменение функциональных свойств протеина [55, 56, 220, 427, 443, 484, 507].

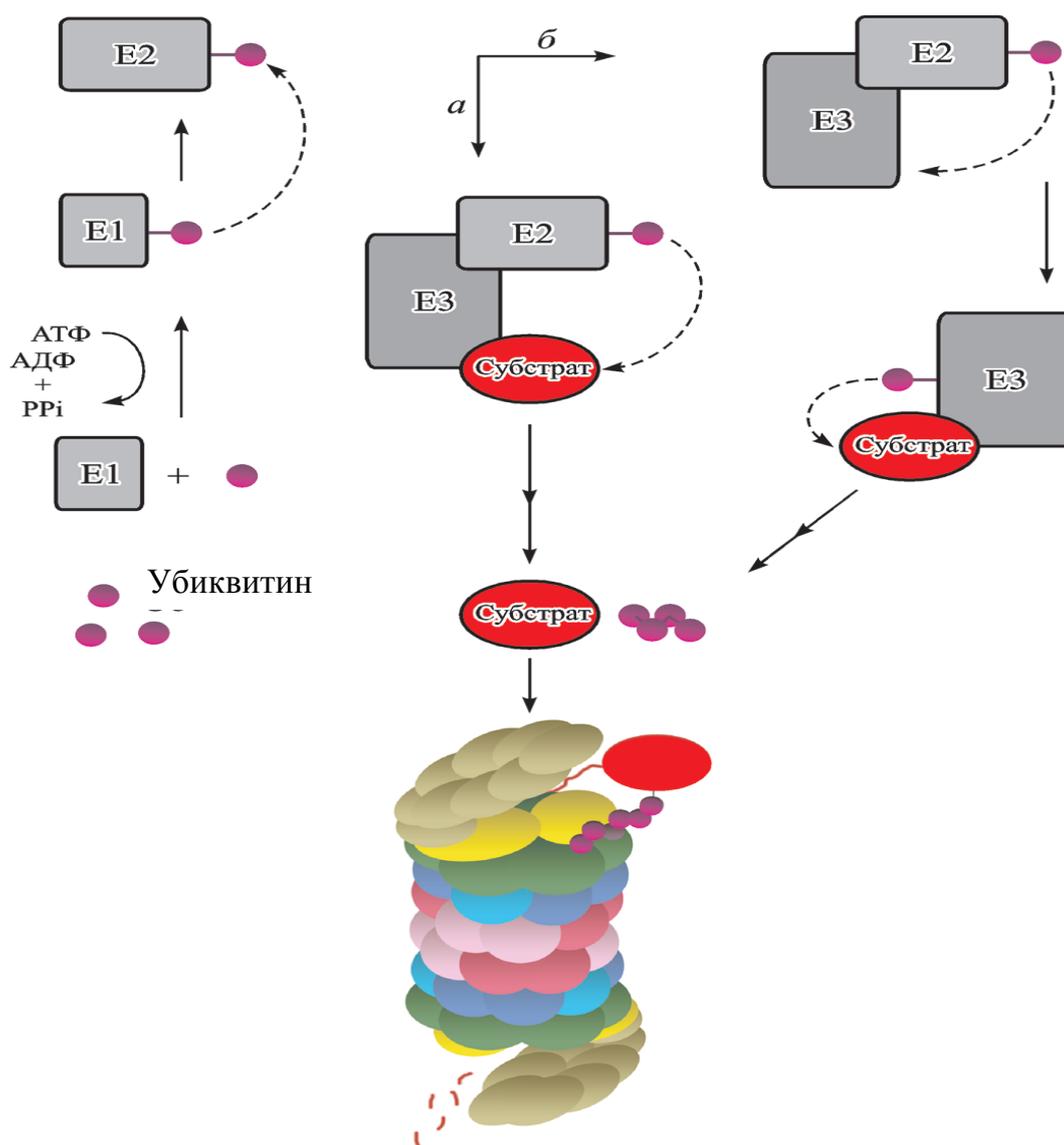


Рисунок 6 – Схема функционирования убиквитин-зависимой протеасомной деградации субстратов (по данным [466])

Примечание – E1 – убиквитин-активирующий фермент, E2 – убиквитин-конъюгирующий фермент, E3 – убиквитинлигаза, а) механизм переноса убиквитина от E2 к субстрату с помощью E3, б) механизм переноса убиквитина с E2 на E3 с последующим присоединением к субстрату

К основным компонентам контроля качества клеточного протеома, которые вовлечены в нековалентный фолдинг или рефолдинг белков относят молекулярные шапероны [80, 135, 161, 164, 237, 278, 411, 434]. Молекулярные шапероны преимущественно являются белками теплового шока, которые подразделяют на пять высококонсервативных семейств: обладающие АТФ-азной активностью (Hsp100, 90, 70, 60) и малые белки теплового шока (sHsp) (Mr=12-43 kDa) [123, 228, 258, 289, 410].

Белки теплового шока играют важную роль в фолдинге и рефолдинге протеинов при ОС, а также препятствуют денатурации и агрегации, сборке и распаду надмолекулярных белковых структур, участвуют в трансмембранном переносе молекул [119, 161, 214, 303]. Наличие карбонильных (нерепарируемых) сшивок полипептидной цепи может указывать на невозможность дальнейшей репарации протеина и вовлечение его в протеолитическую деградацию с участием шаперонов [29, 251, 362].

В строении Hsp70 выделяют высококонсервативный N-концевой нуклеотид-связывающий домен, вариабельный субстрат-связывающий домен и короткий C-концевой домен, который является модулятором шаперонной активности Hsp70. В качестве регуляторов АТФ-азной и шаперонной активности Hsp70 выступают двухдоменные кошапероны – Hsp40 (Hdj) и нуклеотид-обменник Bag-1 [34, 142, 184, 225] (рисунок 7).

В процессе рефолдинга поврежденного белка, совместно с Hsp70, важную роль играют шапероны Hsp90, которые стабилизируют протеины, а также участвуют в сборке и разборке надмолекулярных белковых комплексов [161, 289]. В случае невозможности исправления конформации, белковые молекулы направляются в 26S протеасомы для деградации.

Отмечено, что рефолдинг поврежденных белков выполняется более эффективно после соединения белковых агрегатов с sHsp, в частности с Hsp27 [214, 432]. Малые белки теплового шока обладают высокой аффинностью к белкам, которые находятся в ненативной конформации, тем самым, предотвращая

агрегацию субстратов. Кроме этого, sHsp вносят особый вклад в поддержание целостности мембран при ОС [98].

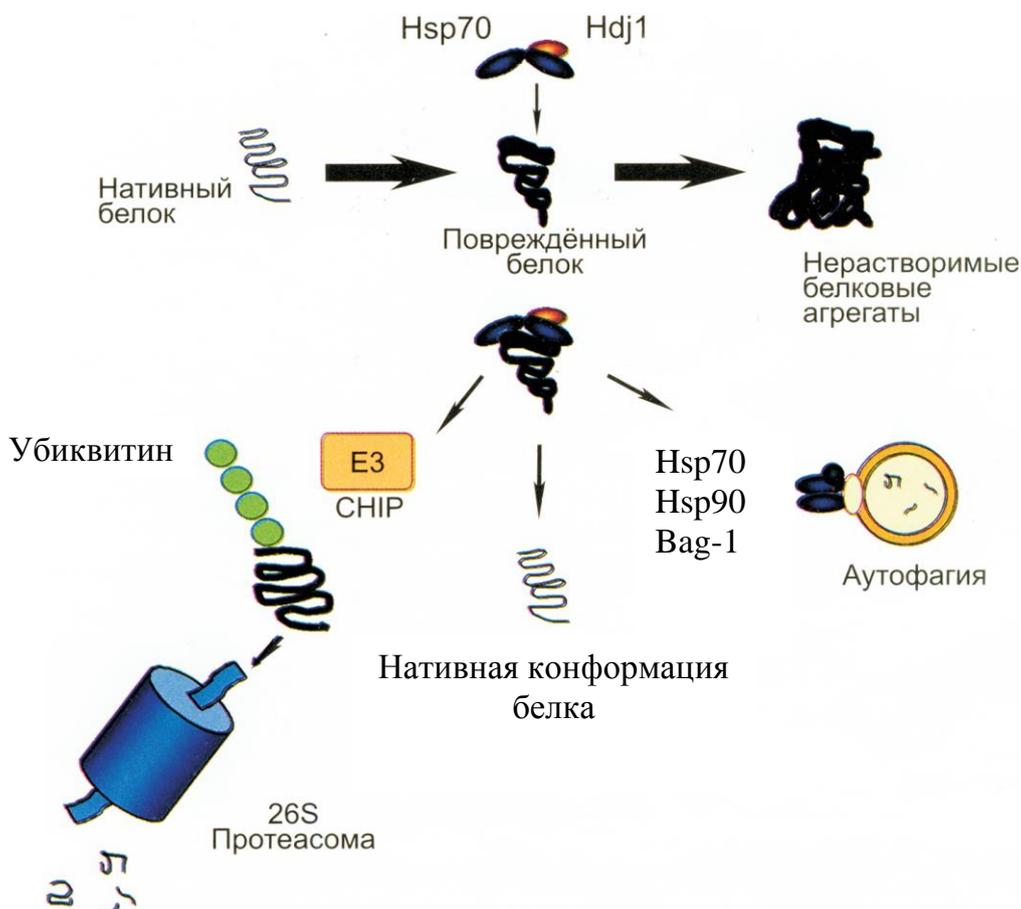


Рисунок 7 – Схема взаимосвязи функционирования Hsp70 и убиквитин-зависимой системы деградации белковых молекул в эукариотической клетке (по данным [34])

Примечание – Hsp70 (heat shock protein) – белок теплового шока 70, Hdj – кошаперон Hsp40, кошаперон Bag-1 – нуклеотид-обменник, E3 – убиквитинлигаза, CHIP – carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein – комплекс интеграции Hsp70 и поврежденного белка, вовлекаемого в протеасомальную деградацию, 26S – субъединица протеасомы

Таким образом, содержание АФК, внутриклеточный редокс-баланс, специфичность радикалов аминокислотных остатков в полипептидах и шаперонная активность в клетке определяют уровень окисленных протеинов, характер обратимости/необратимости ОМБ и функциональную способность надмолекулярных белковых комплексов. Участие кооперативного взаимодействия шаперонов разных семейств особенно возрастает в условиях ОС, что определяет

дальнейшую судьбу белков различной молекулярной массы: рефолдинг и восстановление функциональной активности, либо деградация белковых молекул.

### **1.2.3 Состояние тиолдисульфидной системы при окислительном стрессе**

Важную роль в поддержании внутриклеточного редокс-баланса играют SH-содержащие пептиды и белки. Особое место среди них занимают глутатион - трипептид, образованный цистеином, глутаминовой кислотой, глицином и тиоредоксин (КФ 1.8.4.8) – полифункциональный низкомолекулярный белок (Mr=14 kDa), обладающий оксидоредуктазной активностью [92, 279, 472, 473].

В эукариотической клетке различают цитозольную и митохондриальную изоформы тиоредоксина. Высококонсервативная аминокислотная последовательность цитозольной изоформы содержит активные остатки цистеина в 32- и 35-ом положении, а митохондриальной – в 90- и 93-ом [380, 383, 418]. Следует отметить, что цитозольный тиоредоксин имеет три остатка цистеина в дополнение к двум, локализованным в активном центре. Цитозольная изоформа этого белка способна перемещаться в ядро под действием различных факторов, например, пероксида водорода, форболовых эфиров, TNF $\alpha$  и др. Как цитозольная, так и митохондриальная фракция тиоредоксина могут находиться внутри- и во внеклеточном пространстве [24].

На сегодняшний день установлено, что внутриклеточное содержание тиоредоксина, по сравнению с глутатионом, значительно ниже. Роль этого белка в редокс-регуляции клеточного сигналинга значительнее, чем участие в антиоксидантной защите клетки. Так, цитозольная изоформа тиоредоксина служит коферментом пероксиредоксинов, играет роль ростового фактора, регулирует активность транскрипционных факторов [24, 206, 377, 469, 472]. Известно, что нитрозилирование по Цис<sup>69</sup> позволяет цитозольной изоформе тиоредоксина проявлять антиапоптотическое действие, а глутатионилирование по

Цис<sup>73</sup> может предотвращать его димеризацию, вызываемую ОС. Помимо этого, цитозольная фракция тиоредоксина может претерпевать постраницационную модификацию (частичный протеолиз), в ходе которой теряет 25 аминокислотных остатков и превращается в белок, состоящий из 80 аминокислот. После чего, этот протеин способен секретироваться из клетки и проявлять цитокинподобную активность [24, 192].

Глутатион в клетке присутствует как в окисленной (GSSG), так и восстановленной форме (GSH). Лимитирующим звеном эндогенного синтеза глутатиона является образование  $\gamma$ -глутамилцистеина из соответствующих аминокислот при участии  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазы и глутатионсинтазы. Реакция лимитируется наличием L-цистеина и способностью этого соединения окисляться в L-цистин, которая регулируется GSH [19, 27, 40].

Наличие SH-групп в структуре этих тиолов позволяет глутатиону и тиоредоксину принимать участие в многочисленных жизненно важных клеточных функциях: антиоксидантная защита, поддержание редокс-баланса, регуляция клеточного цикла, дифференцировки и программированной гибели [24, 28, 47, 285, 291, 308, 361, 367, 378, 387, 475].

Основной редокс-чувствительной системой клетки считают тиолдисульфидную систему, к важным компонентам которой относят пары: GSH/GSSG и тиоредоксин-(SH)<sub>2</sub>/тиоредоксин-(S-S). Важно отметить, что в активации транскрипционных факторов роль тиоредоксина в 1000 раз выше, чем у GSH [35, 47, 256].

При различных стрессовых воздействиях и патологических состояниях наблюдается обратимая окислительная модификация SH-групп, приводящая к увеличению количества дисульфидных связей. Такая модификация изменяет состояние белков клеточных мембран, их проницаемость и адгезивные свойства, влияет на активность ферментов, регуляцию пролиферации и апоптоза [27, 30, 280]. SH-соединениям принадлежит ведущая роль в защите клеток от гидроксильного радикала, так как малые значения времени жизни и радиуса

диффузии этого радикала в биологических субстратах делают невозможным существование специализированных протективных систем, подобных супероксиддисмутазе или каталазе. Кроме этого, основной антиоксидантный эффект GSH реализуется посредством его участия в работе ферментов: будучи субстратом для ГПО и глутатион-S-трансферазы, GSH выступает донором атомов водорода для восстановления  $H_2O_2$  и липидных гидроперекисей [19, 27, 279].

Для поддержания адекватного окислительно-восстановительного баланса клетки и редукции дисульфидных связей в белковых молекулах необходима постоянная регенерация окисленных компонентов тиоловой системы в восстановленное состояние. Восстановление окисленного глутатиона осуществляется с помощью глутатионредуктазы (ГР) (КФ 1.6.4.2), а окисленного тиоредоксина – тиоредоксинредуктазы (ТРР) (КФ 1.6.4.5) [7, 19, 24, 27, 92, 279]. Различают три изоформы ТРР, из которых индуцибельной является только цитоплазматическая селенсодержащая ТРР 1 [397, 471]. Для реализации катализа этих редуктазных реакций необходимо наличие восстановленного никотинамидадениндинуклеотид фосфата (НАДФН) в достаточном количестве [433]. Этот нуклеотид восстанавливается преимущественно в реакциях пентозофосфатного пути окисления глюкозо-6-фосфата.

Активный центр ТРР защищен от окисления, благодаря наличию в структуре фермента атома селена, снижающего потенциал восстановления остатков цистеина, что повышает активность фермента при низких значениях рН. Для ТРР млекопитающих характерна широкая субстратная специфичность и способность катализировать восстановление дисульфидов белков, низкомолекулярных соединений, а также гидроперекисей липидов и  $H_2O_2$  (рисунок 8) [279, 511].

В восстановлении дисульфидных связей в белках важную роль играют глутаредоксины (КФ 1.20.4.1) – глутатион-зависимые оксидоредуктазы, относящиеся к суперсемейству тиоредоксинов. В клетках млекопитающих открыты три изоформы глутаредоксинов – дитиольные (цитозольная и

митохондриальная), а также монотиольная (митохондриальная). Субстратами для глутаредоксинов являются низкомолекулярные дисульфиды и дисульфиды белков, которые восстанавливаются по монотиольному и дитиольному механизмам [189]. Монотиольный механизм более характерен для восстановления смешанных дисульфидов белков, подвергшихся глутатионилированию. Это обусловлено тем, что необходимо узнавание глутаредоксином только глутатионилированного участка протеина. Установлено, что функционирование глутаредоксинов тесно сопряжено с активностью ГР, содержанием GSH и GSSG (рисунок 9) [19, 24].

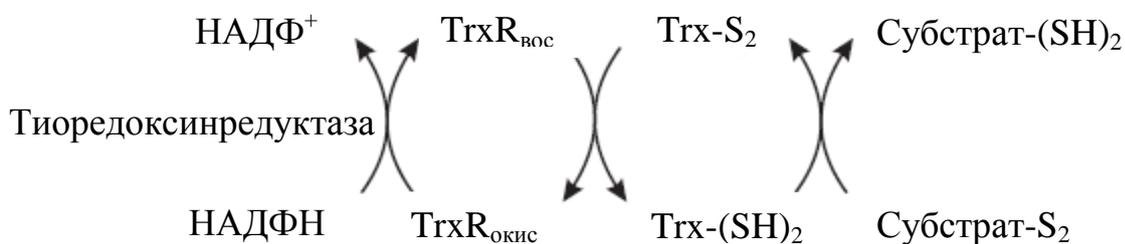


Рисунок 8 – Схема окислительно-восстановительного цикла с участием тиоредоксина (по данным [24, 279])

Примечание – TrxR – НАДФН-зависимая тиоредоксинредуктаза, Trx-S<sub>2</sub> – тиоредоксин окисленный, Trx-(SH)<sub>2</sub> – тиоредоксин восстановленный, субстрат-S<sub>2</sub> – субстрат окисленный, субстрат-(SH)<sub>2</sub> – субстрат восстановленный

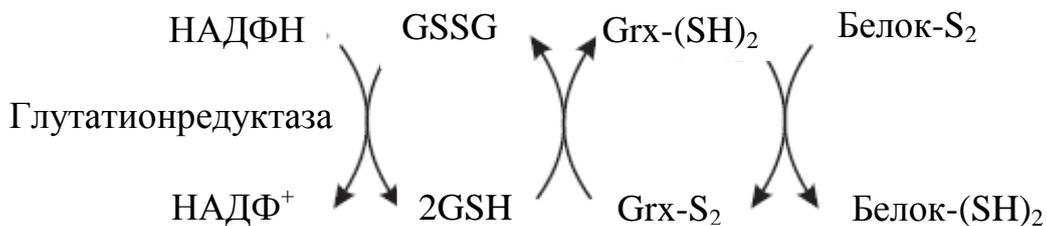


Рисунок 9 – Схема окислительно-восстановительного цикла с участием глутатиона и глутаредоксина (по данным [19, 24])

Примечание – GSH – восстановленный глутатион, GSSG – окисленный глутатион, Grx-(SH)<sub>2</sub> – глутаредоксин восстановленный, Grx-S<sub>2</sub> – глутаредоксин окисленный, белок-S<sub>2</sub> – белок окисленный, белок-(SH)<sub>2</sub> – белок восстановленный

Ключевым ферментом в антиоксидантной защите клеток, как в норме, так и в условиях ОС, является ГПО (КФ 1.11.1.9) [187, 279, 335]. Глутатионпероксидаза является гидрофильным Se-содержащим соединением, что обуславливает локализацию основной части фермента в цитозоле (70 %), а также в митохондриях (20-30 %) всех клеток млекопитающих [274, 318, 511].

Фермент представляет собой тетрамер, который состоит из четырех идентичных сферических субъединиц с молекулярной массой 19 kDa и имеет 2 активных глутатион-связывающих центра. Каждая субъединица содержит по одному атому селена, входящему в состав селеноцистеиновых остатков аминокислот [187].

Глутатионпероксидазы катализируют реакцию восстановления с помощью GSH нестойких органических гидропероксидов, включая гидропероксиды полиненасыщенных жирных кислот, в стабильные соединения – оксикислоты. Все ГПО, подобно каталазе, способны также утилизировать  $H_2O_2$ . Установлено, что сродство ГПО к  $H_2O_2$  выше, чем у каталазы, поэтому первая более эффективно работает при низких концентрациях пероксида водорода, в то же время в защите клеток от ОС, вызванного высокими концентрациями  $H_2O_2$ , ключевая роль принадлежит каталазе [160, 405]. Максимальная активность ГПО наблюдается при  $pH=7,5$ , а закисление среды приводит к снижению активности фермента, в результате чего усиливается цитотоксическое действие  $H_2O_2$  [20].

Таким образом, в клетках постоянно происходит выработка прооксидантов, но их концентрация поддерживается на оптимальном уровне с помощью компонентов антиоксидантной системы. Это необходимо для осуществления жизненно важных внутриклеточных процессов. При различных патологических процессах, сопровождающихся усиленной нагрузкой АФК, потенцируется смещение равновесия прооксиданты-антиоксиданты в сторону преобладания свободно-радикальных процессов.

### **1.3 Окислительный стресс и программированная гибель клеток в патогенезе опухолевого роста**

В настоящее время установлено, что ОС является ключевым звеном в патогенезе многих заболеваний, таких как некоторые нейро-дегенеративные расстройства, сердечно-сосудистые заболевания, бронхиальная астма, ревматоидный артрит и др. [273, 284, 421, 502]. В том числе, ОС лежит в основе возникновения опухолевого процесса, который, в свою очередь, связывают с «ускользанием» опухолевых клеток от механизмов апоптоза [44, 108, 197, 263]. Поэтому выяснение молекулярных особенностей функционирования систем передачи вне- и внутриклеточного апоптогенного сигнала, его реализации в условиях изменения редокс-статуса клеток до сих пор остается актуальным направлением теоретической медицины.

На сегодняшний день накопилось большое количество данных, свидетельствующих об участии свободно-радикальных процессов в патогенезе опухолевой прогрессии. Актуальность поиска молекулярных мишеней дисрегуляции апоптоза опухолевых клеток обусловлена свободно-радикальной теорией канцерогенеза, которая получила в последние годы достаточно широкое признание [108, 141, 375, 493].

Нарушение реализации программы клеточной гибели происходит вследствие дисбаланса про- и антиапоптогенных факторов, с одной стороны, нарушением редокс-статуса клетки и формированием ОС – с другой стороны [20, 13, 37, 50, 108, 118, 197, 198, 249, 281, 350, 373, 481].

Окислительный стресс сопровождается нарушением баланса про-/антиоксиданты и наработкой свободных радикалов. Активные формы кислорода, такие как – супероксидный анион-радикал, пероксид водорода, гидроксильный и пероксидный радикалы, синглетный кислород, а также гипохлорит и пероксинитрит, не только обладают высокой цитотоксичностью в отношении биомолекул клетки, но могут выступать в качестве вторичных мессенджеров,

принимающих сигнал от внешнего воздействия [46, 287, 309, 487, 496]. Нарушение внутриклеточного редокс-статуса сопровождается набуханием митохондрий, диссоциацией кардиолипина с цитохромом С, выходом последнего в цитоплазму, снижением митохондриального потенциала и, как следствие, возникновением гипоэнергетического состояния и активацией апоптоза [287].

### **1.3.1 Роль активных форм кислорода в дизрегуляции апоптоза**

На сегодняшний день доказана роль АФК в качестве сигнальных молекул. Действуя как пара- и/или аутокринный регулятор, АФК активируют протеинкиназу С, фосфолипазу А<sub>2</sub>, NO-синтазу, циклооксигеназу и гуанилатциклазу, которые сами находятся под контролем внутриклеточных сигнальных систем или являются их компонентами [19, 130, 169, 242, 252, 392, 394, 445]. Ряд исследований свидетельствует о наличии у редокс-чувствительных участников сигнальной трансдукции как про-, так и антиапоптотической активности [47, 54, 287], зависящей от особенностей индуцирующих сигналов, комбинации возможных путей их передачи и типа клеток.

Выделяют две основных мишени действия АФК на регуляторные процессы в клетках: взаимодействие с металлосодержащими белками и окисление SH-групп в белковых молекулах.

Одним из фундаментальных механизмов регулирования деятельности клеток и поддержания гомеостаза является их программированная гибель [2, 12, 66, 89]. В настоящее время актуальным направлением теоретических и практических исследований является поиск молекулярных мишеней для селективной регуляции апоптоза. Известно, что АФК могут рассматриваться не только с позиции повреждающих агентов, но и как регуляторные молекулы программированной гибели клеток [19, 246, 264]. Однако, модулирующий эффект АФК на процесс программированной гибели неоднозначен. Опухолевая

трансформация нормальной клетки сопровождается изменением внутриклеточных метаболических процессов, в том числе образования и утилизации АФК [71, 275].

Активные формы кислорода могут осуществлять свое действие на модуляцию апоптоза двумя путями:

1) с помощью непосредственного участия АФК в редокс-сигнализации через сайт-специфичные последовательности рецептора, что приводит к запуску каскада внутриклеточных процессов (протеинкиназные реакции фосфорилирования белков, в том числе и факторов транскрипции);

2) с помощью непосредственного действия АФК на молекулы белков, в том числе ферментов: протеинкиназ, фосфатаз, каспаз и факторов транскрипции.

Активные формы кислорода могут рассматриваться в качестве универсального инструмента опухолевой трансформации ввиду того, что они способны участвовать в поддержании функциональных свойств биологических мембран, внутриклеточных редокс-систем, активности ферментов, в частности протеинкиназ, и регуляции клеточных процессов, таких как пролиферация, дифференцировка и апоптоз [46, 86, 366, 409, 487, 488].

Механизм сенсорного взаимодействия АФК с рецепторами возможен, благодаря наличию доменов, обогащенных цистеином. Так, например, в строении Fas-рецептора характерно наличие трех внеклеточных SH-сайтов. Кроме этого, АФК способны участвовать в индукции апоптоза с помощью рецептор-опосредованного механизма путем взаимодействия со специализированными белковыми комплексами DISC, которые затем активируют каспазу-8 [376].

В случае сигнальной трансдукции через семейство TNF-рецепторов АФК выступают в роли вторичных мессенджеров, оказывая как про-, так и антиапоптогенный эффект [133].

Регуляторное влияние АФК на процессы апоптоза опосредовано через изменение функциональной активности про- и антиапоптогенных факторов. К

настоящему времени установлено несколько десятков таких редокс-регулируемых транскрипционных факторов: антиоксидант-респонсивный элемент (antioxidant responsive element, ARE), NF-κB, p53, Araf-1, ядерный фактор эритроидных производных 2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, Nrf2), активатор транскрипционного фактора-1 (activating protein-1 transcription factor, AP-1) и др. [19, 87, 293, 298]. Наличие цистеиновых остатков в строении факторов транскрипции, которые выступают в качестве сенсоров АФК, обеспечивает их взаимодействие в ДНК-связывающем домене [68, 260, 272, 302, 384]. Активные формы кислорода способны активировать NF-κB с помощью взаимодействия с I-κB в области тирозина в 42 положении, что сопровождается отщеплением ингибиторной субъединицы [327, 348, 393]. Следует отметить, что активация таких факторов транскрипции как NF-κB и AP-1 происходит в ответ на внешние сигналы, а функционирование ARE обеспечивает поддержание гомеостаза в результате стимулов, возникших в ответ на изменения внутриклеточного гомеостаза при апоптоз-индуцирующих, канцерогенных и стрессовых воздействиях [19, 293].

В ряде экспериментальных работ показано, что пероксид водорода в концентрации от 1 до 10 мкмоль усиливает пролиферацию клеток гепатомы человека. С помощью протеинкиназы В происходит активация экспрессии генов *c-fos* и *c-jun*, а также AP-1, который индуцирует экспрессию генов, отвечающих за пролиферацию и дифференцировку клеток [124, 259, 374]. Также установлено, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> является стимулятором синтеза проапоптогенного эффектора p53 за счет активации экспрессии генов *fos/jun* [139, 323, 496]. По результатам проведенных исследований, в клетках гладкой мускулатуры крыс и гепатокарциномы человека (HepG<sub>2</sub>) пероксид водорода необходим для проявления митогенной активности трансформирующего фактора роста β1 (transforming growth factor β1, TGF β1), а также EGF [83, 233, 241, 392, 454]. Добавление H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> к культивируемым мезангиальным клеткам или фибробластам индуцирует фосфорилирование рецептора тирозинкиназ, приводящее к трансактивации EGF. Это тормозит его

убиквитинилирование и эндоцитоз, что сопровождается активацией пролиферации и формированием опухолевой трансформации [162, 499]. Следует отметить, что в процессе взаимодействия с цистеиновыми остатками энзимов,  $O_2^{\cdot-}$  является кинетически более эффективным оксидантом, чем нейтральная молекула пероксида водорода. Так, взаимодействие  $H_2O_2$  с SH-группами цистеина белка превращает их в сульфоновую кислоту, а затем в сульфоновую кислоту [19, 47, 236, 261, 398].

Гидроксильный радикал, генерируемый в реакции Фентона, способен изменять активность MAP-киназ, играющих ключевую роль в процессах пролиферации и программированной гибели клеток [91, 360], а в тандеме с пероксидом водорода – выступать регулятором апоптоза через активацию сигнальной регуляторной киназы (apoptosis signal-regulating kinase, ASK), JNK и p38 MAP-киназы [75, 90, 281, 400, 448]. Индуцируемое  $OH^{\cdot}$  окисление цистеинсодержащего участка АТФ/АДФ-транслоказы, расположенной во внутренней мембране митохондрий, превращает ее в проницаемый неспецифический канал-пору, что способствует выходу в цитоплазму проапоптогенных митохондриальных белков [19, 129].

С другой стороны, АФК оказывают активирующее действие на митохондриальные белки семейства Bcl-2, а именно Bcl-2 и Bcl-X<sub>L</sub>, которые способны расщеплять каспазный активатор Araf-1 или каспазу-8 [154]. Показано, что  $H_2O_2$  может участвовать в регуляции активности каспаз через модуляцию редокс-статуса клеток и окисление цистеиновых остатков активного центра ферментов, в частности прокаспазы-3, вызывая ее инактивацию [153]. Кроме этого, процесс ингибирования апоптоза связан с S-нитрозилированием активного центра каспаз, что способствует «ускользанию» клеток от программированной гибели. Так, Цис<sup>163</sup> активного центра каспазы-3 является ловушкой для  $NO^{\cdot}$ , при этом фермент теряет способность к дальнейшему катализу [324, 420]. Процесс нитрозилирования белков имеет обратимый характер.

Следует отметить, что мишенью АФК могут выступать редокс-чувствительные гены. Так, *c-fos* содержит в своих ДНК-связывающих доменах высокочувствительные SH-группы цистеина – Цис<sup>252</sup>, Цис<sup>154</sup>, Цис<sup>61</sup>. Белок c-Fos непосредственно участвует в процессе фрагментации ДНК и инициировании процессов апоптотической гибели клетки (рисунок 10) [52, 503].

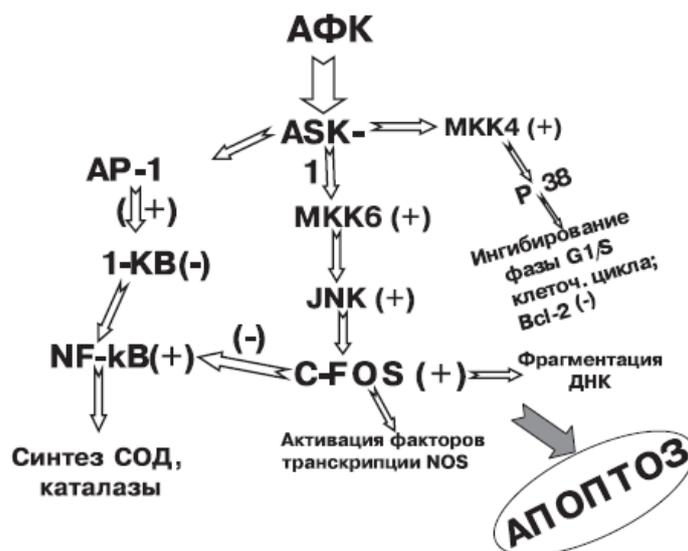


Рисунок 10 – Участие активных форм кислорода в регуляции клеточных функций (по данным [52, 503])

Примечание – АФК – активные формы кислорода, СОД – супероксиддисмутаза, ASK (apoptosis signal-regulating kinase) – сигнал-регуляторная киназа, NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – транскрипционный ядерный фактор κB, МКК (mitogen-activated protein kinase kinases) – митоген-активируемая протеинкиназа киназы, JNK (c-Jun N-terminal kinase) – c-Jun N-терминальная киназа, AP-1 (activating protein-1 transcription factor) – активатор транскрипционного фактора-1, Bcl-2 – белки-регуляторы апоптоза В-клеток лейкемии-2

Таким образом, редокс-статус клетки играет важную роль в функционировании как белков-эффекторов, так и белков-регуляторов апоптоза: ферментов, рецепторов, факторов транскрипции и других, оказывая влияние на их активность. Следовательно, АФК можно считать одними из регуляторов программированной гибели клетки. При этом особый научный интерес представляет поиск специфических молекул, которые могут быть мишенями

редокс-регуляции пролиферирующей, дифференцирующей и апоптотической активности как нормальных, так и опухолевых клеток.

### **1.3.2 Окислительная модификация белков, их деградация и тиолдисульфидная система в дизрегуляции программированной гибели клетки**

Число установленных редокс-чувствительных путей передачи сигнала в клетках постоянно возрастает. В настоящее время актуальным направлением медико-биологической науки является изучение особенностей функционирования молекулярных систем в результате конформационных изменений белковых молекул (фосфорилирование, метилирование, карбонилирование, убиквитинилирование, глутатионилирование, нитрозилирование и др.). Трансдукция внутриклеточного сигнала предполагает непосредственное участие белковых молекул, начиная от взаимодействия лиганда с рецептором (гидрофобная белковая часть рецептора), регуляции активации ферментов, связывания факторов транскрипции с геномом и, заканчивая, трансляцией, фолдингом и рефолдингом белка. При действии АФК на про- и антиапоптотические мишени непосредственно или через внутриклеточные редокс-зависимые сигнал-передающие системы в клетке может происходить одновременная активация нескольких молекулярных путей, взаимодействующих между собой [46, 317, 320, 344, 425].

Регуляция передачи сигнала в клетках связана с изменениями редокс-состояния тиоловых групп белков, пептидов, в том числе глутатиона. Транспорт электронов по боковым цепям функциональных  $-CH_2-SH$ -групп консервативных остатков цистеина белков обуславливает их редокс-чувствительность [10, 97]. Факторы транскрипции, регулирующие программу гибели клетки, могут изменять свою активность под влиянием компонентов редокс-чувствительных сигнальных систем, а также их окислительной модификации. Глутатионилирование белков

является обратимой модификацией макромолекул и важным регуляторным звеном биохимических реакций [19, 24, 77, 206, 280, 344]. Поэтому изучение участия ОМБ в регуляции внутриклеточных процессов и их роли в нарушении реализации апоптоза в опухолевых клетках является актуальной задачей медицины.

Наиболее изучены механизмы активации таких транскрипционных факторов как p53, AP-1 и NF-κB. Центральную роль в контроле активности NF-κB занимает процесс фосфорилирования по Сер<sup>32</sup> и Сер<sup>36</sup> ингибиторных белков (I-κB) с их последующим убиквитинилированием под действием убиквитинлигазы и деградацией на 26S-протеасомах. Кроме этого, различают альтернативный путь активации этого фактора транскрипции путем непосредственного фосфорилирования первичных белков NF-κB1 (p105) и NF-κB2 (p100) с их последующей деградацией на протеасомах и высвобождением активных форм NF-κB1 (p50) и NF-κB2 (p52). В результате высвобождается NF-κB, который проявляет транскрипционную активность только в восстановленной форме [19, 243]. Кроме этого, E. Pineda-Molina с соавторами (2001) показали, что глутатионилирование по Цис<sup>62</sup> в NF-κB (p50) снижает связывание фактора транскрипции с мишенью – ДНК [193]. В составе p53, для поддержания функциональной активности, имеется несколько редокс-чувствительных радикалов цистеина в ДНК-связывающем домене [24]. А регуляция редокс-статуса NF-κB, p53 и AP-1 в ядре клетки находится под контролем тиоредоксина и редокс-фактора 1 (Ref-1) [47, 79, 156].

Кроме этого, в регуляции активности транскрипционных факторов и процесса апоптоза важную роль играет глутаредоксин-зависимая система [157, 188]. Глутаредоксин, катализируя процесс деглутатионилирования, восстанавливает функциональную активность таких белков, как глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, протеинтирозинфосфатаза 1B, креатинкиназа, c-Jun, субъединица p50 NF-κB, каспаза-3 [77, 248, 342]. Также следует отметить, что каспазы представляют собой регуляторные мишени для окислительной редокс-

модификации (глутатионилирования) ввиду наличия цистеина, входящего в состав активного центра ферментов [420, 476].

Показана роль убиквитин-зависимого протеолиза и убиквитин-зависимой модификации белков в регуляции активности апоптоз-регулирующих протеинов [292, 294, 403, 465]. К таким белкам относятся транскрипционные факторы (с-Fos, с-Myc, NF-κB, AP-1, p53), I-κB, белки, контролирующие клеточный цикл, белки семейства Bcl-2, регулирующие выход цитохрома C из митохондрий, а также белки, контролирующие активность каспаз (IAPs) и участвующие в проведении проапоптотического сигнала (с-FLIP) [62, 131, 151, 183, 265, 444, 458, 483]. Так, после убиквитинилирования фосфорилированной ингибиторной субъединицы NF-κB, происходит протеасомальная деградация I-κB и активация фактора транскрипции [62, 265, 492].

Результатом ингибирования протеасом становится накопление p53 и снижение активности NF-κB в клетке, что влечет индукцию апоптоза в пролиферирующих клетках [70]. С другой стороны, накопление необратимо модифицированных белков, наоборот, способствует активации системы протеолиза и запуску апоптоза. В связи с этим на сегодняшний день представляется крайне актуальным исследование роли убиквитин-зависимой деградации модифицированных белков в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток.

Таким образом, конформационные изменения протеинов в своей совокупности не только определяют функциональные возможности отдельной клетки, но и представляют собой молекулярные мишени для фармакологической коррекции патологических процессов. Селективное управление окислительной модификацией белков-регуляторов транскрипции представляется весьма перспективным для регуляции апоптоза на клеточном уровне.

Развивающийся ОС в результате опухолевой трансформации неизбежно влечет повреждение протеинов клетки, нуждающихся в своевременном рефолдинге. Данный факт подтверждается работами, описывающими

гиперэкспрессию белков теплового шока при опухолевой прогрессии [23, 45, 159]. Эти белковые молекулы обладают полифункциональностью и в плане реализации запрограммированной гибели, могут выступать как анти- и проапоптогенные факторы либо в качестве регуляторов активности этих факторов [181, 226, 247, 290, 341, 462]. Показано что, Hsp70 и Hsp27 обладают свойством ингибировать каспазо-зависимый апоптоз, направленно взаимодействуя с цитохромом С и Araf-1, способствуя их связыванию [34, 93, 137, 434]. Кроме этого, Hsp70 и Hsp90 способны связывать Araf-1, ингибировать образование апоптосомы и активность каспазы-9 и -3, снижать уровень экспрессии p53 [159, 340]. Hsp70 регулирует активацию NF-κB и ингибирует активацию JNK- и p38-киназ [73, 512].

Несмотря на наличие большого количества экспериментальных исследований, посвященных изучению роли белков теплового шока в регуляции апоптоза, до сих пор является актуальным выяснение особенностей модулирующего действия шаперонов при опухолевой трансформации клеток в условиях ОС. Таким образом, протективный эффект Hsp связан не только с участием в фолдинге протеинов и рефолдинге поврежденных белков, но с ингибированием апоптотического сигнала на различном молекулярном уровне, что позволяет опухолевым клеткам эффективно «ускользнуть» от апоптоза [26, 215, 217, 226, 310, 390, 462].

Последние данные по изучению механизмов взаимосвязи между тиолдисульфидной системой и активностью факторов транскрипции показали, что при изменении внутриклеточного редокс-баланса глута-, тио- и пероксиредоксины, влияют на активность ДНК-репарирующей эндонуклеазы, за счет стимуляции связывания ДНК с такими ядерными факторами транскрипции как AP-1, AIF, NF-κB, Nrf2, HIF-1α (hypoxia-inducible factor-1α) и p53 [152, 165, 291, 329], а также на активность p38 MAP-киназы, эффекторной каспазы-3, ASK-1 и JNK, тем самым, участвуя в регуляции экспрессии провоспалительных цитокинов [450] и апоптоза [359, 378]. Следует отметить, что активность транскрипции участков генома, кодирующих компоненты тиолдисульфидной

системы, находится под контролем ARE [209, 224]. Кроме этого, установлено, что восстановленный тиоредоксин более активно увеличивает сродство к ДНК NF-κB, чем L-цистеин и восстановленный глутатион, в то время как окисленный тиоредоксин тормозит связывание этого фактора транскрипции со своей мишенью [361].

Таким образом, от состояния внутриклеточной редокс-системы зависит направленность и специфичность метаболических процессов в клетке.

### **Заключение**

Опухолевая прогрессия характеризуется нарушениями пролиферации, дифференцировки и клеточной гибели на фоне развития ОС. Молекулярные механизмы, оказывающие влияние на запуск и регуляцию апоптоза, многочисленны и разнообразны. Дизрегуляция апоптоза клеток является неотъемлемым патогенетическим звеном в формировании многих социально-значимых заболеваний человека, что объясняет актуальность исследований, посвященных поиску молекулярных мишеней для селективного управления программированной гибелью при злокачественных новообразованиях, в том числе гемобластозах. Опухолевая трансформация клеток характеризуется, с одной стороны, ингибированием апоптоза, с другой стороны, – гиперпродукцией АФК и активацией свободно-радикального окисления. В условиях сформированного ОС в опухолевых клетках происходит постоянное окислительное повреждение биополимеров: белков, липидов, ДНК. Среди всех АФК наибольшей повреждающей способностью наделен гидроксильный радикал. Однако, кроме повреждающего действия, АФК отводится роль важных регуляторных молекул, мишенью которых являются внутриклеточные редокс-зависимые сенсоры – SH-группы белков и пептидов. Окислительно-модифицированные молекулы, в результате воздействия АФК, в настоящее время рассматриваются как «сигналы» для регуляции различных клеточных функций, запуска пролиферации и апоптоза. При формировании ОС в клетке может происходить одновременная активация нескольких молекулярных путей инициации программированной гибели,

взаимодействующих между собой на уровне белков-регуляторов и белков-эффекторов.

Ведущую роль в регуляции уровня АФК и поддержании редокс-статуса клеток отводят тиолдисульфидной системе. Механизмы, посредством которых компоненты этой системы влияют на апоптоз, на сегодняшний день мало изучены. Эффекты этой системы основаны на окислительно-восстановительном потенциале редокс-пар: GSH/GSSG и тиоредоксин-(SH)<sub>2</sub>/тиоредоксин-(S-S), а также на активности ферментов, осуществляющих их НАДФН-зависимую редукцию. Кроме этого, GSH, тиоредоксин-(SH)<sub>2</sub> и сопряженные с ними ферментативные редокс-белки (глута-, пероксиредоксины и др.), обеспечивающие процесс глутатионилирования/деглутатионилирования протеинов, участвуют в регуляции внутриклеточного сигналинга и экспрессии редокс-чувствительных участков генома. Для вовлечения в процесс редокс-регуляции белкам-регуляторам и белкам-эффекторам апоптоза, необходимо иметь критические участки молекулы, содержащий остатки цистеина. Многофункциональность компонентов тиолдисульфидной системы дает основание считать их весьма важными для обеспечения жизнеспособности клеток.

Важными стресс-индуцируемыми молекулами, обеспечивающими рефолдинг протеинов, являются белки теплового шока. Процесс рефолдинга протеиновых агрегатов протекает наиболее эффективно при участии тандема АТФ-зависимых Hsp с белками теплового шока малой молекулярной массы. При несостоятельности этого процесса происходит накопление необратимо модифицированных белков, что способствует активации убиквитин-зависимого пути деградации протеинов.

Несмотря на изучение дизрегуляции апоптоза при опухолевом росте, особенности молекулярных механизмов программированной гибели малоизучены [45, 197, 281]. С целью расширения существующих представлений о дизрегуляции апоптоза при злокачественных новообразованиях, в частности гемобластозах, представляется целесообразным использование клеточной линии

Jurkat («Т-лимфобластная лейкемия человека»), клетки которой характеризуются наличием всех компонентов как рецепторного, так и митохондриального путей регуляции программированной гибели.

При попытке рассмотрения апоптоза в качестве сложного многоступенчатого ферментативного процесса, реализация и скорость которого регулируется транскрипцией, трансляцией, фолдингом и своевременным рефолдингом белковых молекул, становится очевидной роль окислительной модификации протеинов. Однако молекулярные механизмы регуляторного влияния обратимой и необратимой окислительной модификации белков на апоптоз опухолевых клеток, особенности участия в этом процессе компонентов тиолдисульфидной системы и шаперонов являются актуальными, малоизученными и требуют детального исследования. Понимание молекулярных механизмов регуляции передачи смерть-индуцирующего сигнала лежит в основе решения проблемы селективного управления апоптозом и направленной коррекции дизрегуляции программированной гибели клеток, как в норме, так и при свободно-радикальной патологии, к которой относится опухолевый рост.

В этой связи, расширение фундаментальных представлений о механизмах дизрегуляции программированной гибели клеток в условиях ОС необходимо для разработки патогенетически обоснованных методов молекулярной коррекции опухолевого роста.

## Глава 2. Материал и методы исследования

### 2.1 Материал исследования

Материалом для исследования служили опухолевые клетки линии Jurkat («Т-лимфобластная лейкемия человека») и лимфоциты крови.

Опухолевые клетки линии Jurkat были получены из Российской коллекции клеточных культур ФГБУН Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, Россия). Данные клетки способны синтезировать интерлейкин-2, ростовой фактор Т-клеток, трансформирующий фактор роста, а также экспрессировать на плазматической поверхности CD3, CD4, FasR, различные рецепторы к хемокинам (CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CXCR4) и высоко-аффинный рецептор к интерлейкину-8. Кариологическая характеристика культуры:  $2n=46$ , пределы изменчивости по числу хромосом – 41-49, модальное число хромосом – 46-47, количество маркеров – 2 (дифференциальная окраска), количество полиплоидов – 2 %.

Лимфоциты крови получали у здоровых лиц (42 мужчины и 38 женщин в возрасте от 20 до 45 лет (средний возраст –  $31 \pm 9$  лет)) из венозной крови, взятой из локтевой вены утром до приема пищи с помощью стандартных вакуумных систем «Becton Dickinson Vacutainer™» (США) с антикоагулянтами: гепарином натрия (25 Ед/мл) или этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) (1,7 мг/мл). Критериями исключения из группы обследованных являлись возраст моложе 20-ти и старше 45-ти лет; наличие в анамнезе острых и хронических инфекционных, воспалительных заболеваний, вирусных инфекций (гепатит, клещевой энцефалит и др.), метаболического синдрома, сахарного диабета, аутоиммунных заболеваний, злокачественных новообразований, психических расстройств, алкогольной и наркотической зависимостей, отсутствие информированного согласия о добровольном участии в

исследовании или несогласие здоровых лиц с требованиями протокола исследования (протокол заседания этического комитета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России № 2110 от 31.10.2011 г. и № 4267 от 21.09.2015 г.).

Исследование проводилось на базе кафедры патофизиологии и кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

### **2.1.1 Культивирование опухолевых клеток линии Jurkat**

Опухолевые клетки линии Jurkat культивировали суспензионным методом в полной культуральной среде (90 % RPMI-1640 («Вектор-Бест», Россия), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Invitrogen», США), инактивированной в течение 30 мин при температуре +56°C, 2 мМ Нерес («Flow», Великобритания), гентамицин (100 мкг/мл) («KRKA», Словения) и L-глутамин (0,3 мг/мл) («Вектор-Бест», Россия)) в стерильных чашках Петри («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) в полуоткрытой системе при температуре +37°C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> с использованием CO<sub>2</sub>-инкубатора «МСО-5АІС» («Sanyo», Япония). Для поддержания культуры опухолевых клеток в логарифмической фазе роста их пересевали каждые 2-3 сут. Оптимальная плотность при пересеве составляла  $3-9 \times 10^5$  клеток/мл.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью 0,4 % раствора трипанового синего («Serva», США), добавляемого к суспензии клеток в расчете 1:1. Подсчет погибших клеток (окрашенных в синий цвет) проводили в камере Горяева. В опыте использовались культуры клеток, содержащие не более 5 % погибших клеток.

### 2.1.2 Выделение мононуклеарных лейкоцитов

Мононуклеарные лейкоциты выделяли методом градиентного центрифугирования в стерильных условиях [105]. Венозную гепаринизированную кровь (25 Ед/мл) выдерживали в течение 40 мин при температуре +37°C для отделения плазмы и эритроцитов. Полученную плазму наслаивали на градиент плотности Ficoll-Paque («Sigma-Aldrich», США) ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>) в соотношении 1:2 и центрифугировали в течение 20 мин при 200 g. После центрифугирования собирали образовавшееся интерфазное кольцо из смеси мононуклеарных клеток в стерильную центрифужную пробирку с 4,5 мл среды RPMI-1640 и центрифугировали 10 мин при 200 g. Далее процедуру отмывки повторяли дважды, последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 200 g.

### 2.1.3 Выделение лимфоцитов крови из мононуклеарной фракции

Выделение лимфоцитов крови проводили на двойном градиенте Перколла [489]. Готовили растворы Перколла («Sigma-Aldrich», США). Стандартный изоосмотический раствор Перколла (SIP) получали смешиванием одного объема 10-ти кратного фосфатно-солевого буфера (pH=7,4) с девятью объемами раствора Перколла ( $\rho=1,130$  г/см<sup>3</sup>). Путем смешивания раствора SIP и среды RPMI-1640 получали 47,5 % и 15,0 % растворы SIP.

К клеточной суспензии добавляли 1,5 мл раствора SIP ( $t=+4^\circ\text{C}$ ), перемешивали и переносили в новую пробирку. Сверху наслаивали 5,0 мл 47,5 % раствора SIP ( $t=+4^\circ\text{C}$ ). Создавали верхнюю фазу посредством 2,0 мл 15,0 % раствора SIP ( $t=+4^\circ\text{C}$ ), затем центрифугировали в течение 45 мин при температуре +4°C и 200 g с использованием центрифуги с функцией охлаждения «Hermle Z383 K» («HERMLE Labortechnik GmbH», Германия).

Собирали интерфазное кольцо (лимфоцитарную фракцию клеток между 15,0 % и 47,5 % растворами SIP). Объем доводили до 5,0 мл средой RPMI-1640 ( $t=+37^{\circ}\text{C}$ ). Далее центрифугировали в течение 10 мин при температуре  $+20^{\circ}\text{C}$  и 200 g.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью 0,4 % раствора трипанового синего, добавляемого к суспензии клеток в расчете 1:1. Подсчет лимфоцитов осуществляли в камере Горяева. Клетки ресуспендировали в концентрации  $4 \times 10^6$  клеток/мл в полной культуральной среде RPMI-1640.

#### **2.1.4 Определение количества CD5-презентирующих лимфоцитов крови**

Количественную оценку CD5-позитивных лимфоцитов крови проводили с помощью проточной цитофлюориметрии с использованием моноклональных антител к человеческому антигену CD5 («Becton Dickinson Pharmingen™», США). В качестве изотипического контроля применяли подкласс иммуноглобулинов IgG<sub>1</sub>, меченых флюоресцеин изотиоционатом (FITC) («Becton Dickinson Pharmingen™», США).

Осадок клеток, содержащий  $5 \times 10^5$  клеток/мл, ресуспендировали в 0,2 мл охлажденного 0,01 М фосфатно-солевого буфера (PBS) (pH=7,4) («Amresco», США), добавляли 0,005 мл моноклональных антител к CD5 и инкубировали в течение 20 мин при температуре  $+18$ - $+26^{\circ}\text{C}$  в темноте. Затем пробы центрифугировали в течение 5 мин при 200 g, удаляли супернатант и полученный осадок растворяли в 0,4 мл PBS (pH=7,4).

Экспрессию CD5 на поверхности клеток детектировали с помощью проточного цитофлюориметра FACS Canto™ II («Becton Dickinson», США) и использованием программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3 («Becton Dickinson», США). Исследуемую популяцию клеток гейтировали по малому угловому светорассеиванию (FSC), характеризующему размер клетки и боковому

светорассеиванию (SSC), характеризующему цитоплазматические и мембранные особенности клетки. Далее оценивали распределение клеток по наличию излучения FITC. Данные представляли в координатах на основе Dot Plot (рисунок 11). Полученный результат выражали в процентах от общего числа клеток.

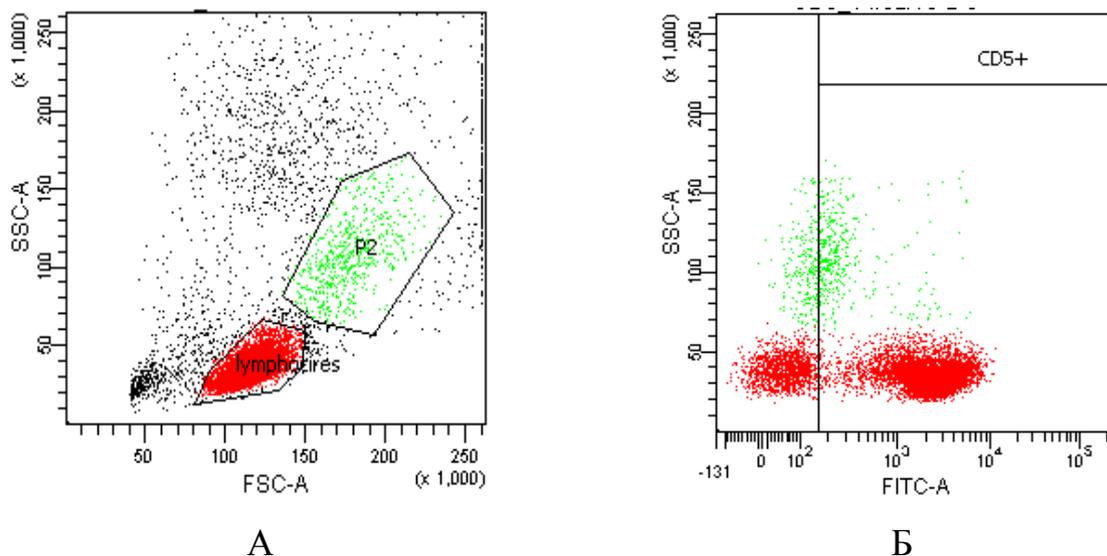


Рисунок 11 – Содержание лимфоцитов крови, несущих на своей поверхности CD5. Характеристика изучаемых клеток: А – выделение гейта однородных клеток по малому угловому (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию (lymphocytes); Б – определение относительного количества клеток, имеющих излучение флюоресцеин изотиоционата (FITC), характеризующих относительное количество CD5-меченных клеток

Примечание – CD (cluster of differentiation) – поверхностный кластер дифференцировки

### 2.1.5 Моделирование экспериментальных процессов в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови

Средством, позволяющим устанавливать взаимосвязи между теорией и опытом в медицинской науке, служит экспериментальная модель [8]. Широко используемым для индукции ОС агентом является пероксид водорода. По данным литературы, концентрации  $H_2O_2$  от 100 до 500 мкМ являются оптимальными для моделирования ОС [25, 167]. Более высокие концентрации (от 1 мМ) активируют запуск запрограммированной гибели клеток, культивируемых *in vitro* [364].

Отсутствие данных литературы об оптимальной конечной концентрации пероксида водорода для добавления в среду инкубации лимфоцитов крови с целью активации их апоптотической гибели и эффективной индукции ОС *in vitro*, сопоставимого с таковым в опухолевых клетках линии Jurkat, определили задачу экспериментального подбора оптимальной концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

На первом этапе исследований интактные опухолевые клетки линии Jurkat и выделенные лимфоциты крови (суспензия клеток, стандартизованная до 4×10<sup>6</sup> клеток/мл) культивировали в стерильных условиях в полной культуральной среде RPMI-1640 при добавлении в среду инкубации различных конечных концентраций пероксида водорода (таблица 1). Клетки инкубировали в течение 18 ч в полуоткрытой системе при температуре +37°C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> с использованием CO<sub>2</sub>-инкубатора «МСО-5АIC» («Sanyo», Япония) в стерильных культуральных 24-х луночных планшетах («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) в объеме 1,0 мл на лунку.

Таблица 1 – Определяемые параметры в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, интактных лимфоцитах крови и при добавлении в среду инкубации различных концентраций пероксида водорода

Показатели	Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	Интактные лимфоциты крови	Конечная концентрация H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> в культуральной среде лимфоцитов крови			
			0,3 мМ	0,5 мМ	1,0 мМ	2,0 мМ
Количество аннексин-положительных клеток	6	6	6	6	6	6
Количество пропидий йодид-положительных клеток	6	6	6	6	6	6
Концентрация активных форм кислорода	6	6	6	6	6	6
Концентрация GSH	10	6	6	6	6	6
Концентрация GSSG	10	6	6	6	6	6
Величина соотношения GSH/GSSG	10	6	6	6	6	6

Примечание – GSH – восстановленный глутатион, GSSG – окисленный глутатион

Для моделирования ОС *in vitro*, выделенные лимфоциты крови (суспензия клеток, стандартизованная до  $4 \times 10^6$  клеток/мл) инкубировали в стерильных условиях в полной питательной среде RPMI-1640 с добавлением пероксида водорода в конечной концентрации 0,5 мМ. Инкубацию клеток проводили в течение 18 ч в полуоткрытой системе при температуре  $+37^\circ\text{C}$  в атмосфере 5 %  $\text{CO}_2$  с использованием  $\text{CO}_2$ -инкубатора «МСО-5АІС» («Sanyo», Япония) в стерильных культуральных 24-х луночных планшетах в объеме 1,0 мл на лунку.

Для оценки участия ОМБ и их деградации, а также компонентов тиолдисульфидной системы в механизмах дизрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии и ОС *in vitro*, клетки линии Jurkat, интактные лимфоциты крови и лимфоциты крови в присутствии 0,5 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  инкубировали в полной культуральной среде RPMI-1640 в течение 18 ч в полуоткрытой системе при температуре  $+37^\circ\text{C}$  в атмосфере 5 %  $\text{CO}_2$  с использованием  $\text{CO}_2$ -инкубатора «МСО-5АІС» («Sanyo», Япония) в стерильных культуральных 24-х луночных планшетах в объеме 1,0 мл на лунку (таблица 2).

На втором этапе работы, для выяснения особенностей молекулярных механизмов ОМБ, их деградации, вклада компонентов тиолдисульфидной системы, Hsp27 и Hsp70 в механизмы дизрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии, клетки линии Jurkat культивировали в присутствии индуктора апоптоза дексаметазона (DEX) («Sigma-Aldrich», США) и/или блокатора SH-групп пептидов и белков N-этилмалеимида (NEM) («Sigma-Aldrich», США), ингибитора синтеза глутатиона *de novo* – бутионин-сульфоксимида (BSO) («Sigma-Aldrich», США), протектора SH-групп пептидов и протеинов – 1,4-дитиоэритритола (DTE) («Sigma-Aldrich», США), ингибитора Hsp27 – 5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазола (KRIBB3) («Sigma-Aldrich», США) в течение 18 ч в полуоткрытой системе при температуре  $+37^\circ\text{C}$  в атмосфере 5 %  $\text{CO}_2$  с использованием  $\text{CO}_2$ -инкубатора «МСО-5АІС» («Sanyo», Япония) в стерильных культуральных 24-х луночных планшетах в объеме 1,0 мл на лунку (таблица 3).

Таблица 2 – Определяемые параметры в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, интактных лимфоцитах крови и в условиях окислительного стресса *in vitro*

Показатели	Интактные лимфоциты крови	Лимфоциты крови+ 0,5 мМ Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub>	Интактные опухолевые клетки линии Jurkat
Количество аннексин-положительных клеток	6	6	6
Количество Fas-положительных клеток	6	–	6
Количество TNF RI-положительных клеток	6	–	6
Активность каспазы-3	6	6	6
Количество клеток со сниженным митохондриальным потенциалом	6	6	6
Содержание Araf-1	6	–	6
Содержание NF-κB	6	6	6
Содержание Hsp27	6	6	6
Содержание Hsp70	6	–	6
Концентрация активных форм кислорода	6	6	6
Содержание гидроксильного радикала	10	10	10
Концентрация GSH	6	6	10
Концентрация GSSG	6	6	10
Величина соотношения GSH/GSSG	6	6	10
Активность глутатионредуктазы	10	10	10
Активность глутатионпероксидазы	10	10	10
Активность тиоредоксинредуктазы	10	10	10
Содержание белок-SH	6	6	6
Содержание белок-SSG	6	6	6
Содержание КПБ	6	6	6
Содержание окисленного триптофана	6	–	6
Содержание битирозина	6	–	6
Уровень экспрессии мРНК гена убиквитина	6	–	6
Содержание убиквитина	6	–	6
Содержание убиквитинлигазы	–	–	6

Примечание – GSH – восстановленный глутатион, GSSG – окисленный глутатион, белок-SH – SH-группы белков, белок-SSG – белково-связанный глутатион, КПБ – карбонильные производные белков

Таблица 3 – Определяемые параметры в опухолевых клетках линии Jurkat при различных условиях культивирования

Показатели	Условия культивирования								
	DEX	NEM	BSO	DTE	KRIBB3	NEM+DEX	BSO+DEX	DTE+DEX	KRIBB3+DEX
Количество аннексин-положительных клеток	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Количество Fas-положительных клеток	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Количество TNF RI-положительных клеток	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Активность каспазы-3	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Количество клеток со сниженным митохондриальным потенциалом	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание Araf-1	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание NF-κB	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание Hsp27	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание Hsp70	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Концентрация активных форм кислорода	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание гидроксильного радикала	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Концентрация GSH	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Концентрация GSSG	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Величина соотношения GSH/GSSG	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Активность глутатионредуктазы	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Активность глутатионпероксидазы	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Активность тиоредоксинредуктазы	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Содержание белок-SH	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание белок-SSG	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание КПБ	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание окисленного триптофана	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание битирозина	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание убиквитина	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Содержание убиквитинлигазы	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Примечание – DEX – дексаметазон, NEM – N-этилмалеимид, BSO – бутионин-сульфоксимин, DTE – 1,4-дитиоэритритол, KRIBB3 – 5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол, GSH – восстановленный глутатион, GSSG – окисленный глутатион, белок-SH – SH-группы белков, белок-SSG – белково-связанный глутатион, КПБ – карбонильные производные белков

N-этилмалеимид, способный проникать в клетку и связывать свободные SH-группы пептидов и белков, использовали в конечной концентрации 5 мМ [408]. При этом достигалось преимущественное связывание SH-групп глутатиона, поскольку GSH выступает основным неферментативным антиоксидантом клетки, поставляющим восстановленные тиоловые группировки в реакциях антиоксидантной защиты [207].

Бутионин-сульфоксимин, выступающий в качестве ингибитора ключевого фермента синтеза глутатиона –  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазы, использовали в конечной концентрации 1 мМ, что позволило, учитывая данные литературы [381], полностью исключить в клетках синтез *de novo* трипептида.

1,4-дитиоэритритол, известный как поставщик восстановительных эквивалентов для регенерации окисленных SH-групп и дисульфидных связей, применяли в конечной концентрации 5 мМ [113].

5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол – производное изоаллоксазола – предотвращал миграцию опухолевых клеток через блокирование протеинкиназа C-опосредованного фосфорилирования Hsp27, напрямую связываясь с шапероном [107, 266]. Также KRIBB3 останавливал клеточный цикл в G<sub>2</sub>/M фазе. Данный ингибитор Hsp27 использовали в конечной концентрации 0,1 мкМ [23].

Для индукции апоптоза изучаемых клеток в культуральную среду добавляли DEX в конечной концентрации 10 мкМ [14]. Дексаметазон (11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-тригидрокси-16 $\alpha$ -метил-9 $\alpha$ -фторпрегна-1,4-диен-3,20-дион) – это синтетический глюкокортикоид, который, оказывая свое действие через внутриклеточные рецепторы, способен инициировать генную транскрипцию, индуцируя синтез кальмодулина, что сопровождалось активацией каспазы-8 и -3 [396, 419, 477].

### 2.1.6 Приготовление лизатов лимфоцитов крови и опухолевых клеток линии Jurkat

Интактные и после инкубации в экспериментальных условиях опухолевые клетки линии Jurkat и лимфоциты крови трижды отмывали от культуральной среды охлажденным PBS (pH=7,4) путем последовательного центрифугирования в течение 5 мин при температуре +4°C и 200 g с использованием центрифуги с функцией охлаждения «Hermle Z383 K» («HERMLE Labortechnik GmbH», Германия), удаления надосадочной жидкости и ресуспендирования в PBS (pH=7,4).

Осадок клеток, содержащий  $4 \times 10^6$  клеток/мл, лизировали путем ресуспендирования в 0,25 мл охлажденного PBS (pH=7,4), содержащего 1 % тритон X-100 (конечная концентрация 0,1 %) («Sigma-Aldrich», США) и использовали для определения активности каспазы-3, ГР, ГПО, TRP, а также оценки ОМБ.

Для определения содержания GSH и GSSG, тиоловых групп белков, белково-связанного глутатиона осадок клеток, содержащий  $4 \times 10^6$  клеток/мл, ресуспендировали в 0,25 мл PBS (pH=7,4), затем депротеинизировали с помощью 5 % раствора сульфосалициловой кислоты («Sigma-Aldrich», США), которая осаждала белки, но не ингибировала активность ГР, далее пробы выдерживали на льду в течение 3 мин. В супернатанте, полученном после центрифугирования в течение 10 мин при температуре +4°C и 9000 g с использованием центрифуги с функцией охлаждения «Hermle Z383 K» («HERMLE Labortechnik GmbH», Германия), определяли содержание GSH и GSSG. Осадок белка использовали для определения концентрации тиоловых групп белков и белково-связанного глутатиона.

К клеточному осадку, содержащему  $4 \times 10^6$  клеток/мл, добавляли 0,02 мл ингибитора протеаз («Amresco», США), 0,16 мл лизирующего буфера (50 мМ трис-HCl (pH=6,8) («Sigma-Aldrich», США), 100 мМ дитиотреитола («Sigma-

Aldrich», США), 2 % додецилсульфата натрия («Helikon», США), 10 % глицерол («Helikon», США), 5 %  $\beta$ -меркаптоэтанол («Helikon», США)) и инкубировали в течение 10 мин на льду, перемешивая через каждые 10-15 мин. Затем после тщательного перемешивания пробы инкубировали в течение 10 мин при температуре  $+95^{\circ}\text{C}$ . Далее клеточные лизаты центрифугировали 10 мин при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  и 14000 g с использованием центрифуги с функцией охлаждения «Hermle Z383 K» («HERMLE Labortechnik GmbH», Германия). После этого в эппендорфы отбирались супернатанты, которые использовали для выполнения вестерн-блотт анализа.

Для определения уровня экспрессии мРНК гена убиквитина и  $\beta$ -актина использовали клеточную суспензию, содержащую  $2 \times 10^6$  клеток/мл.

## **2.2 Методы исследования**

### **2.2.1 Оценка реализации апоптоза**

Детекцию апоптоза проводили при помощи набора Annexin V FITC («TREVIGEN», США). Метод основан на специфическом связывании FITC-меченного аннексина V с фосфатидилсеринем, экспрессированным на внешней стороне цитоплазматической мембраны апоптозных клеток, а также на способности пропидия йодида (PI) интеркалировать с молекулой ДНК.

После инкубации клетки центрифугировали в течение 5 мин при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  и 200 g для их осаждения с использованием центрифуги с функцией охлаждения «Hermle Z383 K» («HERMLE Labortechnik GmbH», Германия), удаляли супернатант и добавляли охлажденный PBS (pH=7,4), ресуспендировали путем пипетирования, затем центрифугировали в течение 5 мин при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  и 200 g и удаляли надосадочную жидкость. Осадок клеток, содержащий  $1 \times 10^6$  клеток/мл, ресуспендировали в 0,4 мл охлажденного связывающего буфера. К клеточной суспензии добавляли 0,001 мл раствора аннексина V, меченного FITC и 0,005 мл раствора PI, затем инкубировали в

темноте в течение 10 мин на льду. Далее пробы разбавляли в 0,4 мл связывающего буфера.

Анализ полученных образцов проводили с помощью проточного цитофлюориметра FACS Canto™ II («Becton Dickinson», США) и использованием программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3 («Becton Dickinson», США). Исследуемую популяцию клеток гейтировали по FSC, характеризующему размер клетки и SSC, характеризующему цитоплазматические и мембранные особенности клетки. Далее оценивали распределение клеток по наличию излучения FITC и аллофикоцианина (APC), что позволяло детектировать аннексин и PI, соответственно. Данные представляли в координатах на основе Dot Plot (рисунок 12). Осуществляли подсчет количества FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> и FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>-меченных клеток к общему числу клеток, результаты выражали в процентах.

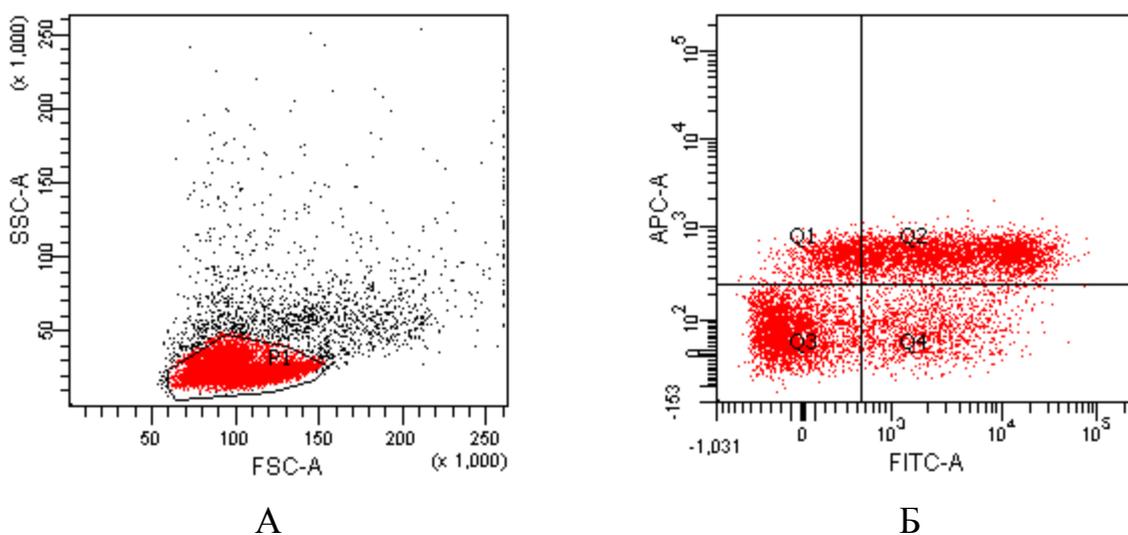


Рисунок 12 – Характеристика изучаемых клеток: А – выделение гейта однородных клеток по малому угловому (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию (PI); Б – определение относительного количества клеток, имеющих излучение флюоресцеин изотиоцианата (FITC) и аллофикоцианина (APC), характеризующих относительное количество FITC<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>-меченных некротических клеток (Q1), FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>-меченных клеток, находящихся на поздней стадии апоптоза (Q2), FITC<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>-меченных жизнеспособных клеток (Q3), FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>-меченных клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза (Q4)

Примечание – PI – пропидия йодид

### 2.2.2 Определение количества TNF RI-презентирующих клеток

Количественную оценку TNF RI-позитивных клеток определяли с помощью проточной цитофлюориметрии с использованием моноклональных антител к человеческому антигену CD120 (TNF RI), конъюгированных с фикоэритрином («R&D Systems», США).

После инкубации клетки центрифугировали в течение 5 мин при температуре +4°C и 200 g с использованием центрифуги с функцией охлаждения «Hermle Z383 K» («HERMLE Labortechnik GmbH», Германия), удаляли супернатант и добавляли 1,0 мл охлажденного PBS (pH=7,4), ресуспендировали путем пипетирования, затем центрифугировали 5 мин при температуре +4°C и 200 g и удаляли надосадочную жидкость. Осадок клеток, содержащий  $1 \times 10^6$  клеток/мл, ресуспендировали в 0,2 мл буфере для иммунофлюоресцентного окрашивания, содержащий однократный PBS (pH=7,4), 0,5 % бычьего сывороточного альбумина, 0,1 %  $\text{NaN}_3$  («Sigma-Aldrich», США), добавляли 0,005 мл моноклональных антител к TNF RI и инкубировали в течение 20 мин при температуре +18-+26°C в темноте. Затем пробы центрифугировали в течение 5 мин при 200 g, удаляли супернатант и полученный осадок растворяли в 0,4 мл PBS (pH=7,4) (согласно протоколу производителя).

Экспрессию TNF RI на поверхности клеток детектировали с помощью проточного цитофлюориметра FACS Canto<sup>TM</sup> II («Becton Dickinson», США) и использованием программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3 («Becton Dickinson», США). Исследуемую популяцию клеток гейтировали по FSC, характеризующему размер клетки и SSC, характеризующему цитоплазматические и мембранные особенности клетки. Далее оценивали распределение клеток по наличию излучения фикоэритрина (PE). Данные представляли в координатах на основе Dot Plot (рисунок 13). Полученный результат выражали в процентах от общего числа клеток.

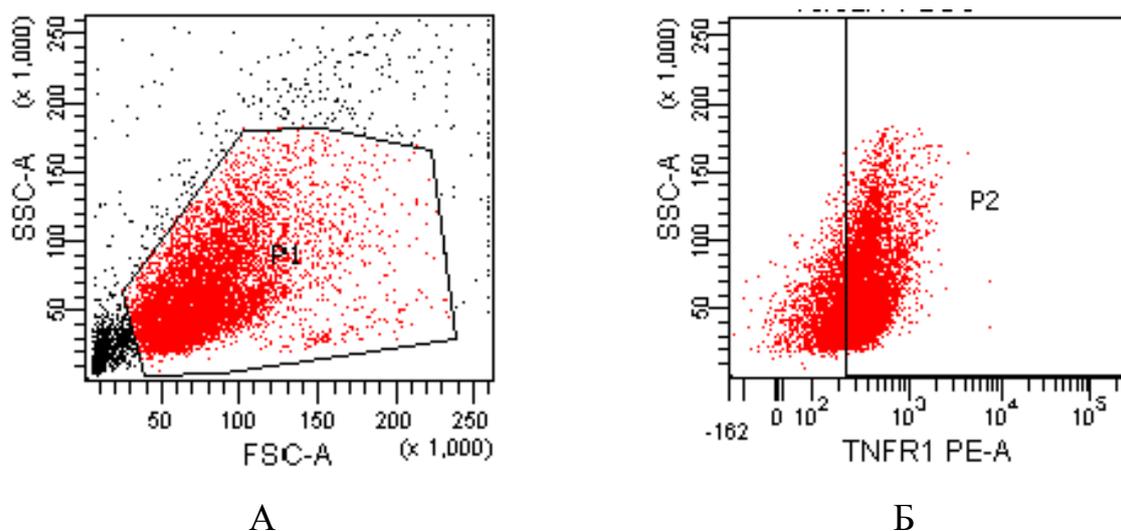


Рисунок 13 – Характеристика изучаемых клеток: А – выделение гейта однородных клеток по малому угловому (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию (P1); Б – определение относительного количества клеток, имеющих излучение фикоэритрина (PE), характеризующих относительное количество TNF RI-положительных клеток

Примечание – TNF RI – tumor necrosis factor receptor I type, рецептор фактора некроза опухоли I типа

### 2.2.3 Определение количества Fas-презентирующих клеток

Количественную оценку Fas-позитивных клеток определяли с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к человеческому антигену CD95 (Fas-рецептору), конъюгированных с FITC («R&D Systems», США).

После инкубации клетки центрифугировали в течение 5 мин при температуре +4°C и 200 g с использованием центрифуги с функцией охлаждения «Hermle Z383 K» («HERMLE Labortechnik GmbH», Германия), удаляли супернатант и добавляли 1,0 мл охлажденного PBS (pH=7,4), ресуспендировали путем пипетирования, затем центрифугировали 5 мин при температуре +4°C и 200 g и удаляли надосадочную жидкость. Осадок клеток, содержащий  $5 \times 10^5$  клеток/мл, ресуспендировали в 0,2 мл буфере для иммунофлуоресцентного окрашивания, содержащий однократный PBS (pH=7,4), 0,5 % бычьего сывороточного альбумина, 0,1 %  $\text{NaN}_3$  («Sigma-Aldrich», США), добавляли

0,005 мл моноклональных антител к Fas-рецепторам и инкубировали в течение 20 мин при температуре +18-+26°C в темноте. Затем пробы центрифугировали в течение 5 мин при 200 g, удаляли супернатант и полученный осадок растворяли в 0,4 мл PBS (pH=7,4) (согласно протоколу производителя).

Экспрессию Fas-рецепторов на поверхности клеток детектировали с помощью проточного цитофлюориметра FACS Canto™ II («Becton Dickinson», США) и использованием программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3 («Becton Dickinson», США). Исследуемую популяцию клеток гейтировали по FSC, характеризующему размер клетки и SSC, характеризующему цитоплазматические и мембранные особенности клетки. Далее оценивали распределение клеток по наличию излучения FITC. Данные представляли в координатах на основе Dot Plot (рисунок 14). Полученный результат выражали в процентах от общего числа клеток.

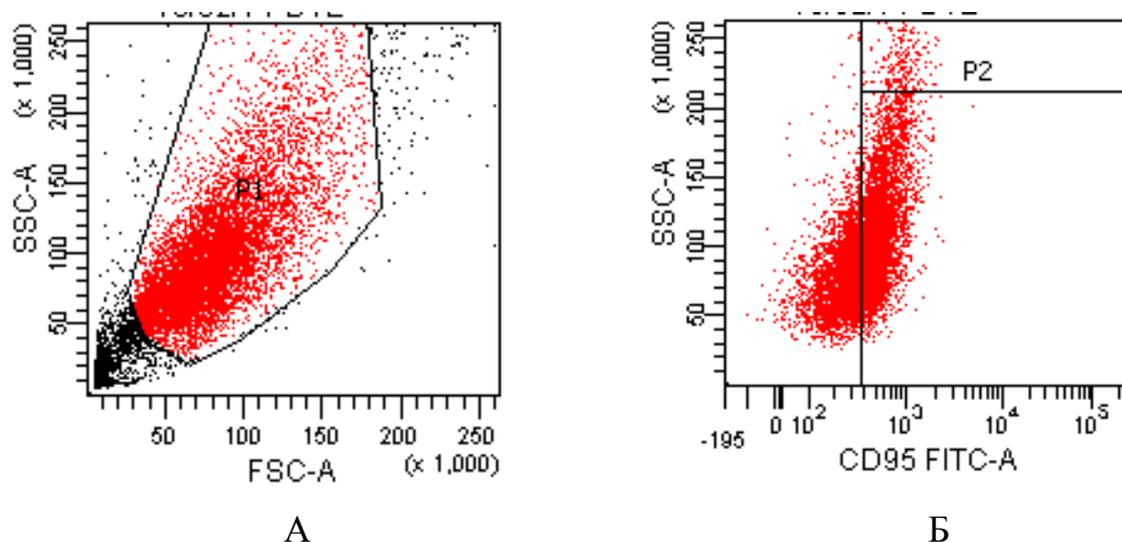


Рисунок 14 – Характеристика изучаемых клеток: А – выделение гейта однородных клеток по малому угловому (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию (P1); Б – определение относительного количества клеток, имеющих излучение флюоресцеин изотиоционата (FITC), характеризующих относительное количество CD95-положительных клеток

Примечание – CD (cluster of differentiation) – поверхностный кластер дифференцировки

#### 2.2.4 Оценка митохондриального потенциала

Метод основан на способности флюорохрома 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолилкарбоцианин йодида (JC-1) существовать в двух различных состояниях: агрегатах и мономерах [300, 422]. JC-1-мономер способен к проникновению через митохондриальную мембрану живой клетки и формированию JC-1-агрегатов, характеризующихся красным спектральным свечением ( $\lambda=590$  нм), которое измерялось на FL-2 канале проточного цитофлюориметра. При деполяризации митохондриальной мембраны JC-1 не накапливался внутри митохондрии и находился в цитоплазме в виде мономерной формы, которая характеризовалась зеленым спектральным свечением ( $\lambda=525$  нм), что измерялось на FL-1-канале.

В полистириновую пробирку переносили 1,0 мл клеточной суспензии ( $1 \times 10^6$  клеток/мл) и центрифугировали в течение 5 мин при 400 g при температуре +18-+26°C. Удаляли супернатант, далее к клеточному осадку добавляли 0,5 мл раствора JC-1, приготовленного *ex tempore* (согласно инструкции производителя «Flow Cytometry Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit Becton Dickinson Biosciences», США). Клетки ресуспендировали и инкубировали в течение 15 мин при температуре +37°C. Затем дважды отмывали рабочим буфером («Becton Dickinson Pharmingen™», США). К полученному осадку добавляли 0,5 мл рабочего буфера и производили измерение на проточном цитофлюориметре FaCS Canto™ II («Becton Dickinson», США) и использованием программного обеспечения FaCS Diva Version 6.1.3 («Becton Dickinson», США).

Гейт исследуемой популяции клеток выделяли по по FSC, характеризующему размер клетки и SSC, характеризующему цитоплазматические и мембранные особенности клетки, затем оценивали распределение по каналам флюоресценции FL-1, характеризующем JC-1-мономеры и FL-2 – JC-1-агрегаты. Данные представляли в координатах на основе Dot Plot (рисунок 15). Полученный результат выражали в процентах от общего числа клеток.

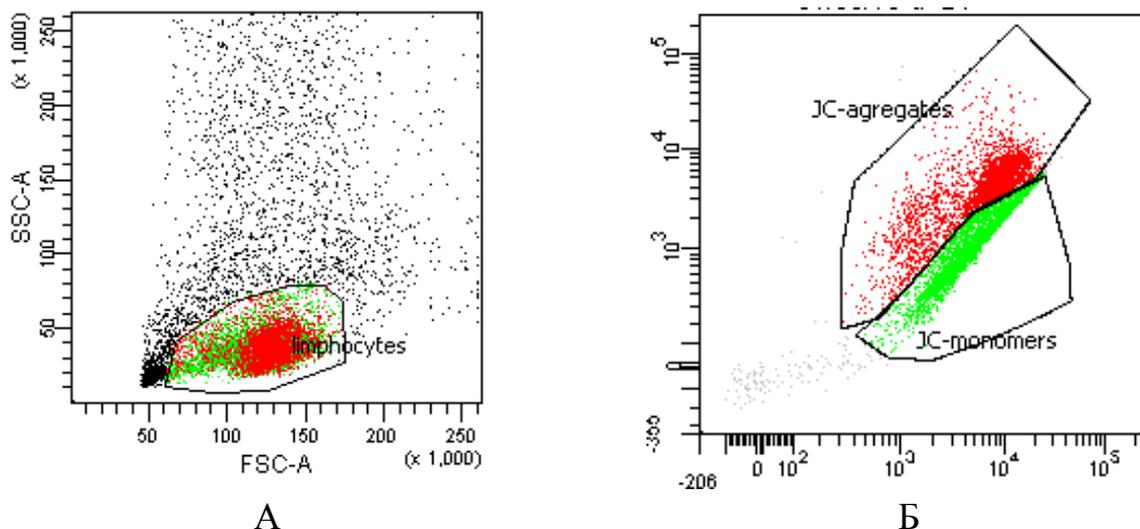


Рисунок 15 – Характеристика изучаемых клеток: А – выделение гейта однородных клеток по малому угловому (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию (lymphocytes); Б – определение относительного количества клеток с поляризованной митохондриальной мембраной (JC-агрегаты) и деполяризованной (JC-мономер)

Примечание – JC – 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин йодид

### 2.2.5 Определение содержания Hsp27, Hsp70, убиквитина, убиквитинлигазы и транскрипционных факторов NF-κB, Araf-1

Определение содержания Hsp27, Hsp70, убиквитина, убиквитинлигазы и транскрипционных факторов NF-κB, Araf-1 проводили с помощью вестерн-блотт анализа в соответствии с протоколом производителя.

Полученные клеточные лизаты ( $4 \times 10^6$  клеток/мл) и маркер молекулярного веса белка (1,7-40 «Fermentas», США и 14,3-220,0 kDa, «Thermo scientific NUNC», Дания) смешивали с 0,005 мл 1 % бромфенолового синего («Helikon», США) и вносили по 0,02 мл в лунки кассеты для электрофореза. Предварительно кассеты заполняли 5 % концентрирующим (1 М трис-HCl буфер (pH=6,8) с 5 % бис-акриламидом («Helikon», США)) и 10 % разделяющим полиакриламидными гелями (1,5 М трис-HCl буфер (pH=8,8) с 10 % бис-акриламидом), содержащих 0,1 % додецилсульфата натрия («Helikon», США), 0,1% персульфата аммония («Bio-Rad», США) и 0,08 % тетраметилэтилендиамина («Helikon», США).

Электрофорез проводили в 25 mM трис-HCl буфере (pH=8,3), содержащим 250 mM глицина («Sigma-Aldrich», США) и 0,1 % додецилсульфата натрия. Стадия префореза проходила в течение 15-20 мин при 120 В, а фореза – 40-60 мин при 160 В.

Далее осуществляли перенос разделенных в геле белков на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) в трансфер-буфере для переноса (25 mM трис-HCl буфер (pH=8,3), содержащего 192 mM глицина («Sigma-Aldrich», США) и 20 % метанола («Sigma-Aldrich», США)) в течение 80 мин при 60 мА.

Нитроцеллюлозную мембрану с перенесенными белками отмывали в течение 5 мин в PBS (pH=7,4), содержащего 0,05 % Tween-20 («Helikon», США) в объеме 20,0 мл. Затем нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в течение 30 мин при температуре +18-+26°C на горизонтальном шейкере («ELMI», Латвия) при 700±100 об/мин в PBS (pH=7,4), содержащего 0,05 % Tween-20 и 1 % желатина.

Далее проводили гибридизацию с первичными моноклональными антителами к NF-κB (активной субъединицы p65 – RelA) («Sigma-Aldrich», США) в разведении 1:1000, Apaf-1 («R&D Systems», США) – 0,25-0,5 мкг/мл, убиквитину («Sigma-Aldrich», США) – 1:1000, убиквитинлигазе («Sigma-Aldrich», США) – 1,0 мкг/мл, фосфорилированным формам Hsp27 («Sigma-Aldrich», США) – 1:2000 и Hsp70 («Sigma-Aldrich», США) – 1:1000 путем инкубирования в течение 1 ч при температуре +18-+26°C и непрерывном покачивании.

Далее нитроцеллюлозную мембрану трижды отмывали 20,0 мл в PBS (pH=7,4), содержащим 0,05 % Tween-20 и вторичные антитела с пероксидазной меткой («Biosource», США) в разведении 1:250000, путем инкубации в течение 30 мин при температуре +18-+26°C на горизонтальном шейкере («ELMI», Латвия) при 700±100 об/мин. После этого проводили детекцию разделенных белков путем добавления хемилюминесцентного субстрата пероксидазы хрена («Invitrogen», США).

Вывод о содержании исследуемого белка в клетке делали по изменению отношения величины сигнала метки искомого белка к величине сигнала белка цитоскелета  $\beta$ -актина («Sigma-Aldrich», США), используя программное обеспечение ImageJ2x Version 2.1.4.7 («Wayne Rasband National Institutes of Health», США). Результаты выражали в условных единицах (у.е.).

### 2.2.6 Определение активности каспазы-3

Принцип метода основан на избирательном гидролизе активированной каспазой-3 синтетического тетрапептидного флюоригенного субстрата N-ацетил-(Асп-Глу-Вал-Асп)-7-амино-4-метилкумарина (Ac-DEVD-AMC) («Sigma-Aldrich», США) с образованием продукта – амино-4-метилкумарина, который флюоресцировал в диапазоне длин волн 430-460 нм (максимум возбуждения флюоресценции при длине волны 360 нм). Специфичность субстрата для каспазы-3 обеспечивалась последовательностью аминокислот, идентичной таковой в одном из естественных субстратов данной протеазы – поли(АДФ-рибозо)полимеразы, в которой фермент способен гидролизовать пептидную связь в позиции Асп<sup>216</sup> [134, 319].

Активность каспазы-3 определяли в пробе, содержащей 2,42 мл 25 мМ трис-НСl буфера (рН=7,4) с 125 мМ КСl, 10 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА Na («Amresco», США) [441] и 0,1 мл клеточного лизата ( $4 \times 10^6$  клеток/мл). До внесения исследуемого материала и субстрата пробирки со средой инкубации прогревали в течение 10 мин при температуре +37°C. Реакцию запускали внесением 0,035 мл 1,48 мМ раствора субстрата Ac-DEVD-AMC, приготовленного путем растворения в диметилсульфоксиде. После инкубации в течение 1 ч при температуре +37°C измеряли интенсивность флюоресценции на флюориметре («ФЛЮОРАТ 02 АБЛФ-Т Люмэкс», Россия) (длина волны возбуждения флюоресценции – 360 нм, длина волны испускания флюоресценции

– 430 нм). Интенсивность флюоресценции была прямо пропорциональна активности каспазы-3.

Активность каспазы-3 рассчитывали как разность между интенсивностью флюоресценции опытной и контрольной пробы, включающей 2,47 мл 25 мМ трис-НСl буфера (рН=7,4), содержащий 125 мМ КСl, 10 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА Na и 0,035 мл 1,48 мМ раствора субстрата Ac-DEVD-AMC. Активность фермента рассчитывали с учетом разведений и выражали в пмоль/(мин×мг белка в пробе).

### **2.2.7 Определение концентрации активных форм кислорода**

Концентрацию внутриклеточных АФК определяли с помощью красителя с заблокированной флюоресценцией – 2,7-дихлорфлюоресцеина диацетата («Sigma-Aldrich», США) [204]. 2,7-дихлорфлюоресцеин диацетат, изначально не флюоресцирующий, пассивно проникающий внутрь клетки и под действием эстераз переходящий в полярное соединение, не способное диффундировать обратно из клетки, которое после взаимодействия с пероксидом водорода превращается во флюоресцирующий метаболит – дихлорфлюоресцеин.

Осадок клеток, содержащий  $2 \times 10^6$  клеток/мл, ресуспендировали в 0,09 мл охлажденного PBS (рН=7,4), добавляли 0,01 мл раствора дихлорфлюоресцеина диацетата и инкубировали в течение 20 мин при температуре +37°C. Затем добавляли 0,011 мл ЭДТА Na и продолжали инкубацию в течение 30 мин при температуре +37°C. После центрифугирования в течение 1 мин при 200 g и удаления супернатанта, к осадку добавляли 0,2 мл стандартного лизирующего буфера для удаления примеси эритроцитов. Затем пробы центрифугировали в течение 1 мин при 200 g, удаляли супернатант, а клеточный осадок ресуспендировали в 0,2 мл охлажденного PBS (рН=7,4). Пробы вновь центрифугировали в течение 1 мин при 200 g, удаляли супернатант, к осадку добавляли 0,4 мл охлажденного PBS (рН=7,4) и проводили измерение концентрации АФК.

Содержание АФК в клетках определяли с помощью проточного цитофлюориметра FACS Canto™ II («Becton Dickinson», США) и использованием программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3 («Becton Dickinson», США). Исследуемую популяцию клеток гейтировали по FSC, характеризующему размер клетки и SSC, характеризующему цитоплазматические и мембранные особенности клетки. Далее оценивали интенсивность флуоресценции 2,7-дихлорфлуоресцеина в клетках. Данные представляли в координатах на основе Dot Plot (рисунок 16). Результаты выражали в у.е. (уровень свечения дихлорфлуоресцеина на клетку).

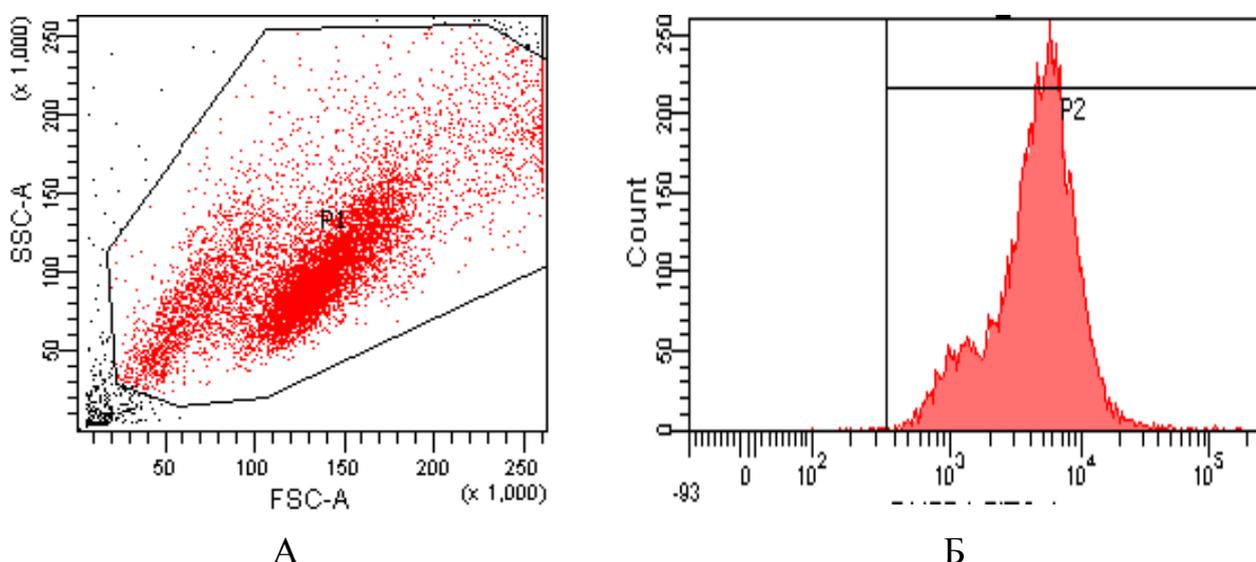


Рисунок 16 – Характеристика изучаемых клеток: А – выделение гейта однородных клеток по малому угловому (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию (P1); Б – гистограмма интенсивности свечения 2,7-дихлорфлуоресцеина при флуоресцентном окрашивании

### 2.2.8 Оценка продукции гидроксильного радикала

Принцип метода основан на разрушении субстрата – 2-дезоксид-рибозы гидроксильным радикалом, образуемым опсонизированными клетками [474].

В две опытные пробы, содержащие по 0,25 мл клеточной суспензии ( $4 \times 10^6$  клеток/мл), добавляли 0,25 мл 15 мМ раствора 2-дезоксид-рибозы («Sigma-Aldrich», США) и 0,03 мл раствора зимозана («Sigma-Aldrich», США). В

одну из проб добавляли 0,25 мл 240 мМ раствора абсолютного этанола, в другую – 0,25 мл среды Хэнкса («Sigma-Aldrich», США). Обе пробы инкубировали в течение 30 мин при температуре +37°C, затем добавляли по 0,6 мл 1 % раствора тиобарбитуровой кислоты («Sigma-Aldrich», США) и по 0,6 мл 2,8 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), инкубировали 15 мин при температуре +100°C, охлаждали и центрифугировали в течение 10 мин при 300 g. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре СФ-2000-02 («Спектр», Россия) при длине волны 532 нм. Расчет проводили с учетом разведения и коэффициента молярной экстинкции образующегося продукта ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). Результаты выражали в нмоль/мг белка в пробе.

### **2.2.9 Определение содержания восстановленного и окисленного глутатиона**

Содержание восстановленного и окисленного глутатиона определяли методом, предложенным М.Е. Anderson (1985) в модификации S. Kojima и соавторов (2004) [262].

Принцип метода основан на взаимодействии восстановленного глутатиона с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой (ДТНБ) – реактивом Элмана – с образованием тио-2-нитробензойной кислоты, водный раствор которой имел максимум поглощения при длине волны 412 нм. При этом образовывался окисленный глутатион, который восстанавливался ГР и восстановленная форма трипептида вновь взаимодействовала с ДТНБ. Скорость образования окрашенного продукта пропорциональна содержанию общего глутатиона.

Для определения окисленной формы трипептида пробы предварительно инкубировали с блокатором SH-групп – 2-винилпиридином, который необратимо связывал в пробе восстановленный глутатион и, в данном случае, скорость образования окрашенного продукта была пропорциональна содержанию окисленного глутатиона.

Количество общего глутатиона (GSH+GSSG) определяли в пробе, содержащей 1,25 мл 0,1 М Na-фосфатный буфер (pH=7,5) в составе 1 мМ ЭДТА Na, 0,4 мМ НАДФН («Sigma-Aldrich», США), 0,3 мМ ДТНБ («Sigma-Aldrich», США), 1 Ед/мл ГР («Sigma-Aldrich», США) и 0,25 мл клеточного лизата ( $4 \times 10^6$  клеток/мл).

При измерении уровня окисленного глутатиона супернатант предварительно инкубировали в течение 30 мин с 10 мМ раствором 2-винилпиридина («Wako», Япония), после чего определяли скорость реакции в описанной выше инкубационной среде. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре СФ-2000-02 («Спектр», Россия).

Расчет содержания общего и окисленного глутатиона производили с помощью калибровочных графиков, для построения которых растворы GSH («Sigma-Aldrich», США) и GSSG («Sigma-Aldrich», США) в концентрации от 3 до 100 мкМ обрабатывали аналогично опытным пробам. Концентрацию восстановленного глутатиона рассчитывали как разницу между концентрацией общего и окисленного глутатиона. Результаты представляли в нмоль/мг белка в пробе. Дополнительно рассчитывали величину соотношения GSH/GSSG как показатель редокс-статуса клетки.

### 2.2.10 Определение концентрации SH-групп белков

Принцип метода основан на способности тиоловых соединений при взаимодействии с ДТНБ образовывать окрашенное соединение – тио-2-нитробензойную кислоту, водный раствор которой имел максимум поглощения при длине волны 412 нм [297].

Количество SH-групп протеинов определяли в пробе, содержащей 0,1 мл осадка белка, растворенного в 0,4 мл 0,01 М фосфатного буфера (pH=7,0), к которому добавляли 0,1 мл 0,4 мг/мл ДТНБ и измеряли поглощение на спектрофотометре СФ-2000-02 («Спектр», Россия) при 412 нм против контроля,

содержащего вместо осадка белка дистиллированную воду. Расчет производили с учетом коэффициента молярной экстинкции  $13 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . Результаты выражали в нмоль/мг белка в пробе.

### **2.2.11 Определение содержания белково-связанного глутатиона**

Метод основан на способности  $\text{NaBH}_4$  высвобождать глутатион из связи с белками, содержание которого измерялось спектрофотометрическим методом [297].

Для определения содержания белково-связанного глутатиона 1,0 мл осадка белка инкубировали в течение 1 ч при температуре  $+50^\circ\text{C}$  с 1,0 мл 1 % раствора  $\text{NaBH}_4$  («Amresco», США). Оставшийся белок осаждали добавлением 0,4 мл 30 % раствора ТХУ (при нагревании в течение 15 мин с последующим охлаждением на льду в течение 5 мин) и удаляли центрифугированием. Супернатант смешивали с 2,5 мл 0,01 М фосфатного буфера (рН=7,0) и добавляли 2,0 мл ацетона для полного окисления  $\text{NaBH}_4$ . Пробы отмывали пять раз с равными объемами диэтилового эфира для удаления ТХУ, после чего в них определяли общее содержание глутатиона, как описано выше. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре СФ-2000-02 («Спектр», Россия).

### **2.2.12 Определение активности глутатионредуктазы**

Принцип метода основан на способности ГР восстанавливать GSSG до 2 GSH в присутствии НАДФН и дальнейшем взаимодействии GSH и ДТНБ с образованием тио-2-нитробензойной кислоты, водный раствор которой имел максимум поглощения при длине волны 412 нм [504].

Для оценки ферментативной реакции вносили 0,1 мл клеточного лизата ( $4 \times 10^6$  клеток/мл) в инкубационную смесь, которая содержала 1,0 мл 0,05 М

Na-фосфатного буфера (pH=7,4) с 1 mM ЭДТА Na, 0,2 мл 0,5 mM НАДФН, 0,2 мл 4 mM ДТНБ. Реакцию инициировали путем добавления 0,1 мл 11 mM раствора GSSG. Измерение скорости реакции проводили на спектрофотометре СФ-2000-02 («Спектр», Россия) при длине волны 412 нм. Активность фермента рассчитывали с учетом разведений и выражали в нмоль/(мин×мг белка в пробе).

### **2.2.13 Определение активности тиоредоксинредуктазы**

Метод основан на способности ТРР катализировать НАДФН-зависимое восстановление субстратов, реагирующих с ДТНБ, образуя тио-2-нитробензойной кислоту, раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм [447].

Для оценки ферментативной реакции вносили 0,05 мл клеточного лизата ( $4 \times 10^6$  клеток/мл) в инкубационную смесь, которая содержала 2,6 мл 500 mM калий-фосфатного буфера (pH=7,0) с 50 mM KCl и 10 mM ЭДТА Na, 0,3 мл 0,24 mM НАДФН. Реакцию инициировали добавлением 0,15 мл 25 mM раствора ДТНБ, оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-2000-02 («Спектр», Россия) при длине волны 412 нм сразу после начала реакции и через 3 мин. Активность фермента рассчитывали с учетом разведений и выражали в нмоль/(мин×мг белка в пробе).

### **2.2.14 Определение активности глутатионпероксидазы**

Метод основан на способности ГПО катализировать реакцию взаимодействия GSH с гидропероксидом трет-бутила [36]. Активность фермента оценивали по изменению содержания GSH в пробах до и после инкубации с модельным субстратом с помощью цветной реакции с ДТНБ.

Для осуществления ферментативной реакции 0,2 мл клеточного лизата ( $4 \times 10^6$  клеток/мл) смешивали с 0,73 мл сложного буфера (готовили в день

исследования разведением 78 мг  $\text{NaN}_3$  («Sigma-Aldrich», США), 100 мг GSH в 100 мл 0,1 М трис-НСl буфера (рН=8,5) с 0,01 % ЭДТА Na). Смесь выдерживали в течение 10 мин при температуре  $+37^\circ\text{C}$ . Реакцию инициировали внесением в реакционную смесь 0,07 мл 0,14 % раствора гидропероксида трет-бутила («Sigma-Aldrich», США). Через 5 мин инкубации при температуре  $+37^\circ\text{C}$  реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 20 % раствора ТХУ. В контрольные пробы 0,14 % раствор гидропероксида трет-бутила вносили после осаждения белка ТХУ. Полученные пробы центрифугировали в течение 10 мин при 300 g.

Супернатант использовали для определения количества GSH. К 0,1 мл супернатанта добавляли 2,65 мл 0,1 М трис-НСl буфера (рН=8,5) с 0,01 % ЭДТА Na и 0,025 мл метанолового раствора ДТНБ. После перемешивания учитывали оптическую плотность пробы, измеренную на спектрофотометре СФ-2000-02 («Спектр», Россия) при длине волны 412 нм против дистиллированной воды. Концентрацию GSH определяли по калибровочной кривой. Активность фермента рассчитывали с учетом разведений и выражали в мкмоль/(мин $\times$ мг белка в пробе).

### **2.2.15 Определение содержания карбонильных производных белков**

Для определения содержания карбонильных производных белков (КПБ) использовали набор «Carbonyl Proteine ELISA Kit» («Immundiagnostik AG», Германия).

Метод основан на твердофазном иммуноферментном «сэндвичном» анализе (ИФА) и заключался в связывании КПБ с динитрофенилгидразином (ДНФГ), адсорбированном на лунках иммунологического планшета, с последующим взаимодействием сначала с биотин-мечеными анти-ДНФГ-антителами, затем – со стрептовидином, сопряженным с пероксидазой хрена для образования конъюгата. Количество конъюгата определяли с помощью цветной

реакции с использованием субстрата пероксидазы хрена – пероксида водорода и хромогена – тетраметилбензидина.

Процедуру выполнения ИФА проводили согласно протоколу исследования, предлагаемого производителем набора. Вносили по 0,2 мл отрицательного, положительного контроля и стандартов в лунки №0-4. В оставшиеся лунки помещали 0,2 мл клеточного лизата ( $4 \times 10^6$  клеток/мл) и инкубировали планшет с пробами в течение 3 ч при температуре  $+37^\circ\text{C}$  на горизонтальном микропланшетном инкубаторе-шейкере «Stat Fax 2200» («Awareness Technology», США) при  $700 \pm 100$  об/мин. После этого удаляли содержимое лунок. Затем путем 5-ти кратного последовательного внесения и удаления 0,25 мл промывочного буфера выполняли промывку лунок планшета. Далее в каждую лунку вносили 0,2 мл разведенных биотин-меченных анти-ДНФГ-антител (1:100) и инкубировали в течение 20 мин при температуре  $+18$ - $+26^\circ\text{C}$ . После этого удаляли содержимое лунок и промывали, как описано выше. Далее в каждую лунку добавляли по 0,2 мл раствора стрептовидина, сопряженного с пероксидазой хрена, выдерживали в течение 20 мин при температуре  $+18$ - $+26^\circ\text{C}$ . После этого удаляли содержимое лунок и промывали пять раз, как описано выше. Далее в каждую лунку вносили по 0,2 мл раствора смеси субстрата для пероксидазы хрена – пероксида водорода и хромогена – тетраметилбензидина. После инкубации в течение 20 мин при температуре  $+18$ - $+26^\circ\text{C}$  в темноте реакцию останавливали добавлением 0,05 мл стоп-реагента в каждую лунку планшета. Содержимое каждой лунки тщательно перемешивали путем пипетирования и регистрировали оптическую плотность плашки на микропланшетном ридере «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм.

Расчет концентрации карбонильных производных протеинов производили по калибровочной кривой. Результаты представляли в нмоль/мг белка в пробе.

### 2.2.16 Определение содержания битирозина и окисленного триптофана

Содержание битирозина и окисленного триптофана проводили методом, описанным K.J. Davies (1987) [145] в модификации Э.М. Бекмана и соавторов (2006) [48].

В результате окисления фенилаланина в составе молекул белка могут появляться орто-, мета-, пара-тирозины, а их одноэлектронное окисление способно генерировать долгоживущий тирозин-радикал, который, взаимодействуя с аналогичным радикалом, образует стабильный к влиянию различных протеаз битирозин, обладающий характерной голубой флюоресценцией. Окисление триптофановых остатков способно сопровождаться снижением флюоресценции, характерной для триптофана. Битирозин и окисленный триптофан являются стабильными маркерами окислительной модификации белков, поскольку в нативных молекулах протеинов они отсутствуют.

В опытную пробу в стерильных условиях добавляли 0,1 мл клеточного лизата ( $4 \times 10^6$  клеток/мл), 4,8 мл 0,07 М фосфатного буфера (pH=7,4); для индукции ОМБ добавляли 0,1 мл раствора  $\text{CuSO}_4$  до конечной концентрации в пробе 1 мМ. В контрольную пробу также вносили 0,1 мл лизата клеток ( $4 \times 10^6$  клеток/мл) и 4,9 мл 0,07 М фосфатного буфера (pH=7,4). Обе пробы инкубировали в стерильных условиях в течение 20 ч при температуре +37°C. Для регистрации снижения флюоресценции триптофана при длине волны возбуждения 295 нм и длине волны испускания 325 нм, а также флюоресценции образованного битирозина при длине волны возбуждения 325 нм и длине волны испускания 415 нм использовали спектрофлюориметр «СМ 2203» («Solar», Белоруссия). Результаты представляли в у.е./мг белка в пробе.

### 2.2.17 Оценка уровня экспрессии мРНК гена убиквитина

Для количественного определения уровня мРНК гена убиквитина использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Принцип метода заключался в анализе кинетики накопления продуктов амплификации исследуемого гена с помощью интеркалирующего флюоресцентного красителя SYBR Green I. Связываясь с формирующейся в процессе элонгации двухцепочечной ДНК, SYBR Green I активировался и начинал флюоресцировать. Образующийся комплекс ДНК-краситель поглощает свет в синей части спектра ( $\lambda_{\max}=488$  нм) и излучает свет в зеленой части спектра ( $\lambda_{\max}=522$  нм). Интенсивность флюоресценции возрастала пропорционально количеству продукта амплификации.

Выделение тотальной РНК из клеток осуществляли сорбентно-колоночным методом с помощью набора реагентов «AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit» («Axygen Biosciences», США) согласно протоколу производителя. При выполнении данного протокола центрифугирование проводили с помощью центрифуги «Hermle Z383 K» («HERMLE Labortechnik GmbH», Германия).

Клеточную суспензию ( $2 \times 10^6$  клеток/мл) переносили в пробирку объемом 1,5 мл, центрифугировали в течение 5 мин при 200 g и температуре  $+4^{\circ}\text{C}$ , удаляли супернатант. К полученному осадку клеток добавляли 0,4 мл лизирующего буфера R-I, тщательно перемешивали путем 8-10-ти кратного пипетирования, избегая вспенивания. Затем добавляли 0,15 мл нейтрализующего буфера R-II и перемешивали на вортексе в течение 30 сек, далее центрифугировали в течение 5 мин при 12000 g при температуре  $+18$ - $+26^{\circ}\text{C}$ . Супернатант переносили в пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 0,25 мл изопропанола и перемешивали на вортексе в течение 30 сек. Полученный раствор переносили в колонку, помещенную в пробирку объемом 2,0 мл, далее центрифугировали в течение 1 мин при 6000 g и температуре  $+4^{\circ}\text{C}$ . Из пробирки удаляли фильтрат и снова

помещали в нее колонку, в которую добавляли 0,5 мл промывочного буфера W1A, затем центрифугировали в течение 1 мин при 12000 g и температуре +4°C. Из пробирки удаляли фильтрат и снова помещали в нее колонку, в которую добавляли 0,7 мл обессоливающего буфера W2, затем центрифугировали в течение 1 мин при 12000 g и температуре +4°C, повторяя эту процедуру дважды. Из пробирки удаляли фильтрат и снова помещали в нее колонку, затем центрифугировали в течение 1 мин при 12000 g и температуре +4°C, после чего колонку переносили в чистую пробирку объемом 1,5 мл, добавляли в центр мембраны колонки 0,07 мл элюирующего буфера TE, предварительно прогретого в течение 3 мин до температуры +60°C. Затем инкубировали в течение 15 мин при температуре +18-+26°C. Далее центрифугировали в течение 1 мин при 12000 g и температуре +4°C. После этого опять добавляли в центр мембраны колонки 0,07 мл элюирующего буфера TE и инкубировали в течение 15 мин при температуре +18-+26°C, затем центрифугировали в течение 1 мин при 12000 g и температуре +4°C. После этого на дне пробирки получали 0,1 мл тотальной РНК. Количественное определение выделенного препарата РНК проводили на спектрофотометре NanoVue Plus («GE Healthcare», США). Степень очистки препаратов РНК от белка определяли по показателю соотношения плотности экстинции A260/A280. Препарат РНК считался чистым, если отношение значений 260/280 нм равно 1,8. Оценку качества выделенного препарата РНК проводили по итогам электрофоретического разделения в 1,5% агарозном геле, в буфере TAE x1 (40 mM Трис-уксусная кислота («Sigma-Aldrich», США), 1 mM ЭДТА Na (pH=8,0) («Sigma-Aldrich», США)). Чистота всех тестируемых образцов тотальной РНК оценивали по наличию в агарозном геле после проведения электрофореза двух бандов, соответствующих 18S и 28S субъединицам рРНК («Евроген», Россия). Детекцию результатов электрофореза проводили при помощи CCD камеры GelDoc XR («Bio-Rad», США) в ультрафиолитовом свете.

Далее синтезировали комплементарную ДНК (кДНК) на матрице мРНК с помощью обратной транскрипции с помощью набора реагентов «MMLV RT kit»

(«Евроген», Россия), который содержит обратную транскриптазу вируса лейкемии мышей (MMLV ревертаза). Фермент получен из рекомбинантного штамма *E. Coli*, экспрессирующего ген MMLV ревертазы дикого типа.

Для этого готовили реакционную смесь, состоящую из 0,009 мл (0,5-2 мкг) РНК, 0,001 мл (100 нг) статического праймера ( $N_9$ ) (праймер к среднестатистической последовательности ДНК), 0,01 мл RT-буфера (280 mM трис-НСl буфера (pH=8,7), содержащего 30 mM  $MgCl_2$ , 10 mM дитиотреитола, 375 mM KCl, 0,4 mM смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов – dNTP), 200 единиц активности ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Реакцию обратной транскрипции проводили в течение 60 мин при температуре +42°C.

Далее проводили ПЦР в режиме реального времени с использованием специфических праймеров для гена убиквитина, нормировочного гена  $\beta$ -актина и набора реагентов «qPCRmix-HS SYBR» («Евроген», Россия) на амплификаторе «RotorGene Q» («QIAGEN», Германия). Для этого была использована реакционная смесь в объеме 0,025 мл, в состав которой входили высокопроцессивная Taq ДНК-полимераза со специфическими моноклональными антителами (HS Tag ДНК-полимераза), интеркалирующий флюоресцентный краситель SYBR Green I, смесь нуклеотидтрифосфатов,  $Mg^{2+}$ , реакционный буфер, деионизированная вода. В каждую пробу к реакционной смеси вносили 0,002 мл специфических праймеров к гену убиквитина (for: 5'-CCG-TGG-GTA-GTG-GTT-GAT-CT-3'; rev: 5'-AGC-GAT-TCC-GCA-TCG-TCA-G-3'; 116 пар нуклеотидов) [168] или к  $\beta$ -актину (for: 5'-CCT-GTA-CGC-CAA-CAC-AGT-GC-3'; rev: 5'-ATA-CTC-CTG-CTT-GCT-GAT-CC-3'; 140 пар нуклеотидов) [399], а также добавляли 0,002 мл кДНК и выполняли амплификацию. Цикл амплификации: 95°C 5 мин, 1 цикл; 95°C 30 сек, 62°C 30 сек, 72°C 1 мин, 45 циклов; 72°C 5 мин (рисунок 17).

Для пары праймеров были подобраны оптимальные режимы амплификации. Для этого варьировали температуру отжига праймеров, 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 порогового цикла (Ct) (номер цикла в точке пересечения кинетической кривой порогового уровня) цикла превышала значение 0,5 цикла; индекс корреляции между расчетными значениями количества кДНК в пяти точках (пять последовательных 2-х кратных разведений) и экспериментальными значениями превышал 0,95; эффективность реакции амплификации была более 90 %; специфичность реакции амплификации подтверждалась при анализе кривых плавления (отсутствию дополнительных пиков на кривой плавления), а также электрофоретическим анализом в агарозном геле.

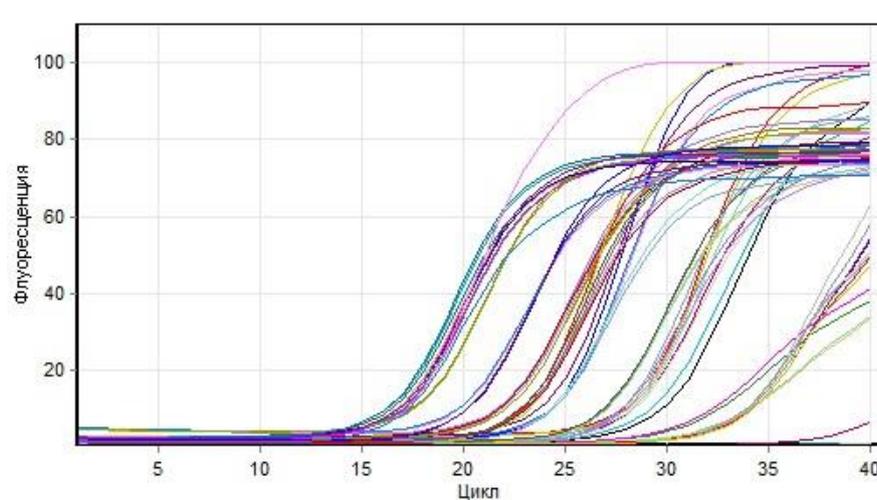


Рисунок 17 – Графическое представление в логарифмических координатах кинетики накопления продукта полимеразной цепной реакции в режиме реального времени гена убиквитина и гена  $\beta$ -актина при амплификации экспериментальных образцов интактных лимфоцитов крови и опухолевых клеток линии Jurkat. Каждый из образцов представлен в двух повторах

Температуру плавления праймеров ( $T_m$ ), определяющую температуру отжига олигонуклеотидов на матрице, определяли эмперическим путем при проведении ПЦР в режиме, позволяющем задавать градиент температур в пределах амплификатора. Температуру плавления продукта амплификации, определяющую температуру съема флуоресцентного сигнала, вычисляли при

анализе кривой плавления.

Количественное выражение результатов проводили с помощью расчета разницы экспрессии гена убиквитина относительно экспрессии гена  $\beta$ -актина (нормировочный ген, который экспрессируется в относительно равной степени в изучаемых клетках) по формуле  $2^{\Delta Ct}$  ( $dCt=2^{(Ct \text{ нормировочного гена} - Ct \text{ искомого гена})}$ ) [416]. Уровень экспрессии мРНК гена убиквитина выражали в у.е.

### **2.2.18 Определение концентрации общего белка**

Метод основан на взаимодействии красителя Кумасси голубого G-250 с остатками аргинина и лизина белковых молекул. Молекулы свободного красителя имеют максимум поглощения при длине волны 495 нм. В результате образования комплекса с остатками аргинина и лизина в белковой молекуле краситель имел максимум поглощения при длине волны 595 нм [112].

К 0,1 мл клеточному лизату ( $4 \times 10^6$  клеток/мл) добавляли 1,0 мл рабочего раствора Кумасси голубого G-250 («Sigma-Aldrich», США). Содержимое пробирок тщательно перемешивали. Пробы инкубировали в течение 3 мин при температуре  $+18$ - $+26^\circ\text{C}$  и измеряли их оптическую плотность на спектрофотометре СФ-2000-02 («Спектр», Россия) при длине волны 595 нм против контроля, содержащего 0,1 мл воды и 1,0 мл рабочего раствора Кумасси голубого G-250.

Содержание белка в мг/мл рассчитывали по калибровочной кривой, для построения которой использовали разведения стандартного раствора альбумина (1,0 мг/мл), содержащие 10, 20, 40, 60, 80, 100 мкг белка в пробе.

### **2.2.19 Статистическая обработка результатов исследования**

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез [11]. Обработку данных проводили с

использованием пакета программ «Statistica 6.0» for Windows. Нормальность распределения признаков проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилки. Описательный анализ выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения, включал расчет медианы ( $Me$ ), первого ( $Q_1$ ) и третьего ( $Q_3$ ) квартилей. Сравнительный анализ уровня статистической значимости различий трех и более выборок проводили с помощью непараметрического аналога дисперсионного анализа –  $H$ -критерия Крускала-Уоллиса. Уровень статистической значимости различий между попарно-несвязанными выборками оценивали с использованием непараметрического  $U$ -критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Уровень статистической значимости взаимосвязи между различными параметрами внутри исследуемых выборок оценивали с помощью критерия ранговой корреляции Спирмена, вычисляя коэффициент корреляции ( $r_s$ ). При проверке статистических гипотез и оценке коэффициентов корреляции критический уровень значимости ( $p$ ) был равен 0,05.

### Глава 3. Результаты собственных исследований

#### 3.1 Моделирование окислительного стресса *in vitro* в лимфоцитах крови

В настоящее время известно, что ряд патологических состояний, в том числе опухолевый рост сопровождаются ОС и дисрегуляцией апоптоза [44, 108, 197]. Активные формы кислорода участвуют в повреждении белков, липидов, ДНК, нарушая процессы апоптоза, редокс-баланс, регуляцию внутриклеточной передачи сигнала и др. [175, 252, 392, 445].

Для изучения процесса дисрегуляции апоптоза в условиях ОС и поиска молекулярных мишеней воздействия на клеточную гибель используются модели, созданные *in vitro*, получившие в экспериментальной медицине и биологии широкое распространение [8, 16, 25, 167]. Одним из способов индукции апоптоза является воздействие пероксида водорода на изучаемые клетки [51, 364].

Малочисленные данные литературы об особенностях реагирования системы глутатиона в лимфоцитах крови в зависимости от концентрации пероксида водорода *in vitro*, разнообразие способов индикации фенотипических проявлений апоптоза и некроза определили необходимость экспериментального подбора оптимальной концентрации пероксида водорода, способной эффективно индуцировать развитие ОС и запуск запрограммированной гибели максимального числа лимфоцитов крови, но не их элиминацию по пути некроза.

С целью индукции ОС мы использовали концентрации пероксида водорода: 0,3; 0,5; 1,0 и 2,0 мМ для внесения в среду инкубации лимфоцитов крови (таблица 4).

Для подтверждения объекта исследования – лимфоциты крови – использовали типирование изучаемых клеток по CD5 при помощи метода проточной цитофлюориметрии с применением анти-CD5, меченных FITC. Так, количество CD5-положительных лимфоцитов крови составило 95,00 (94,50-96,00) %.

Таблица 4 – Концентрация активных форм кислорода, восстановленного и окисленного глутатиона, величина соотношения восстановленной и окисленной формы пептида, количество аннексин-положительных и пропидий йодид-положительных интактных клеток опухолевой линии Jurkat, интактных лимфоцитов крови и при различных концентрациях пероксида водорода в среде инкубации, (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Показатели	Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	Интактные лимфоциты крови	Конечная концентрация H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> в инкубационной среде лимфоцитов крови			
			0,3 мМ	0,5 мМ	1,0 мМ	2,0 мМ
Активные формы кислорода, у.е.	0,650 (0,491-1,980)	0,105 (0,099-0,122) p <sub>1</sub> <0,05	0,452 (0,344-0,650) p <sub>2</sub> <0,05	0,714 (0,570-1,922) p <sub>2</sub> <0,05	0,812 (0,780-1,233) p <sub>2</sub> <0,05	1,561 (1,431-1,893) p <sub>2</sub> <0,05
Количество аннексин-положительных клеток, %	5,20 (4,00-5,60)	23,12 (21,90-24,50) p <sub>1</sub> <0,05	36,05 (21,05-37,09) p <sub>1</sub> <0,05	67,90 (53,10-69,30) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	15,04 (12,78-19,34) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	7,56 (6,09-11,98) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
Количество пропидий йодид-положительных клеток, %	0,35 (0,15-0,45)	2,09 (0-3,80) p <sub>1</sub> <0,05	6,98 (3,67-7,90) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	7,22 (6,45-8,09) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	44,44 (37,67-47,01) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	67,98 (43,20-82,23) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
GSH, нмоль/мг белка	2,051 (1,927-2,314)	0,747 (0,741-0,880) p <sub>1</sub> <0,05	1,908 (1,895-1,922) p <sub>2</sub> <0,05	2,084 (1,523-2,160) p <sub>2</sub> <0,05	2,218 (1,910-3,190) p <sub>2</sub> <0,05	1,832 (1,780-1,854) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
GSSG, нмоль/мг белка	0,164 (0,150-0,190)	0,110 (0,099-0,114) p <sub>1</sub> <0,05	0,140 (0,139-0,143) p <sub>1</sub> <0,05	0,168 (0,152-0,169) p <sub>2</sub> <0,05	0,136 (0,111-0,140)	0,249 (0,167-0,306) p <sub>2</sub> <0,05
GSH/GSSG	13,140 (11,361-14,230)	7,165 (6,517-8,000) p <sub>1</sub> <0,05	13,590 (13,439-13,813) p <sub>2</sub> <0,05	12,410 (10,714-12,781) p <sub>2</sub> <0,05	17,480 (14,964-22,949) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	7,038 (5,360-10,963) p <sub>1</sub> <0,05

Примечание – p<sub>1</sub> – уровень статистической значимости различий по сравнению с интактными опухолевыми клетками линии Jurkat, p<sub>2</sub> – уровень статистической значимости различий по сравнению с интактными лимфоцитами крови; GSH – восстановленный глутатион, GSSG – окисленный глутатион

Добавление в среду инкубации лимфоцитов крови пероксида водорода в конечной концентрации равной 0,5 мМ сопровождалось максимальным процентом аннексин-положительных и минимальным относительным содержанием PI-положительных клеток на фоне увеличения концентрации АФК, сопоставимой с их уровнем в интактных опухолевых клетках линии Jurkat (таблица 4).

Оптимальным индикатором степени формирования ОС в клетке является интегральный показатель – соотношение восстановленного глутатиона к окисленному [28, 126]. Следует отметить, что при добавлении пероксида водорода в конечной концентрации 0,3 мМ и 0,5 мМ в среду инкубации лимфоцитов крови были получены сопоставимые значения величины интегрального показателя GSH/GSSG по сравнению с результатом в интактных опухолевых клетках линии Jurkat.

Таким образом, с целью изучения молекулярных механизмов дисрегуляции апоптоза в условиях ОС в опухолевых клетках линии Jurkat оптимальной конечной концентрацией пероксида водорода для внесения в среду инкубации лимфоцитов крови является 0,5 мМ, так как при этом процесс некротической гибели активировался минимально и создавались условия, позволившие с наибольшей вероятностью воспроизвести внутриклеточный уровень АФК, характерный для опухолевых клеток.

### **3.2 Параметры реализации и регуляции апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови**

Универсальными индукторами изменений внутриклеточного редокс-статуса в ответ на стрессовые воздействия выступают активные кислородные метаболиты, продукты перекисного окисления липидов. В патогенезе опухолевой прогрессии АФК могут выступать не только с позиции повреждающих агентов, но и как регуляторные молекулы [226, 287, 309, 459]. В настоящее время активно

рассматривается роль окислительно-модифицированных макромолекул в дисрегуляции запрограммированной гибели клеток. Поэтому нами был предпринят методический подход – моделирование ОС *in vitro* в лимфоцитах крови. С этой целью мы вносили в среду инкубирования лимфоцитов пероксид водорода.  $H_2O_2$  является окислителем средней силы, электростатически нейтральной, гидрофобной молекулой, которая способна свободно диффундировать через клеточные мембраны.

В интактных лимфоцитах крови провели оценку реализации и завершенности апоптоза путем определения числа аннексин-положительных клеток и активности каспазы-3, а также установили число клеток со сниженным митохондриальным потенциалом и содержание транскрипционных факторов – NF-κB и Araf-1. Так, количество аннексин-положительных лимфоцитов крови составило 23,12 (21,90-24,50) %, клеток со сниженным митохондриальным потенциалом 8,90 (8,00-10,00) %, содержание антиапоптотического фактора транскрипции NF-κB – 1,470 (1,445-1,500) у.е., проапоптотического фактора транскрипции Araf-1 – 0,308 (0,302-0,318) у.е. и активность эффекторного фермента апоптоза каспазы-3 – 108,44 (103,48-112,66) пмоль/мин×мг белка (таблица 5).

При моделировании ОС *in vitro* количество аннексин-положительных лимфоцитов крови составило 67,90 (53,10-69,30) %, клеток со сниженным митохондриальным потенциалом – 18,70 (17,80-20,80) %, содержание антиапоптотического фактора транскрипции NF-κB – 3,015 (3,010-3,022) у.е., активность каспазы-3 – 224,16 (220,34-227,18) пмоль/мин×мг белка, что было достоверно выше в 2,94 ( $p<0,05$ ), в 2,10 ( $p<0,05$ ), в 2,07 раза ( $p<0,05$ ), соответственно, по сравнению с показателями в интактных лимфоцитах крови (таблица 5).

Оценка количества апоптотически измененных интактных опухолевых клеток линии Jurkat показала достоверно значимое снижение процента аннексин-положительных клеток в 4,45 раза ( $p<0,05$ ) и в 13,06 раза ( $p<0,05$ ) по сравнению

со значениями в интактных лимфоцитах крови и лимфоцитах крови, инкубированных в присутствии 0,5 мМ пероксида водорода, соответственно (таблица 5).

Таблица 5 – Параметры, характеризующие реализацию и регуляцию апоптоза в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, интактных лимфоцитах крови и в условиях окислительного стресса *in vitro*, (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы		Количество аннексин-положительных клеток, %	Количество клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, %	Активность каспазы-3, пмоль/мин×мг белка	Содержание NF-κB, у.е.	Содержание Araf-1, у.е.
Интактные лимфоциты крови	1	23,12 (21,90-24,50)	8,90 (8,00-10,00)	108,44 (103,48-112,66)	1,470 (1,445-1,500)	0,308 (0,302-0,318)
Лимфоциты крови +0,5 мМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	67,90 (53,10-69,30) p <sub>2-1</sub> <0,05	18,70 (17,80-20,80) p <sub>2-1</sub> <0,05	224,16 (220,34-227,18) p <sub>2-1</sub> <0,05	3,015 (3,010-3,022) p <sub>2-1</sub> <0,05	–
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	3	5,20 (4,00-5,60) p <sub>3-1</sub> <0,05 p <sub>3-2</sub> <0,05	18,00 (15,10-19,00) p <sub>3-1</sub> <0,05	36,58 (22,66-43,89) p <sub>3-1</sub> <0,05 p <sub>3-2</sub> <0,05	3,106 (3,095-3,128) p <sub>3-1</sub> <0,05	1,884 (1,856-1,917) p <sub>3-1</sub> <0,05

Примечание – Здесь и в таблицах 6, 7, 11, 17: p<sub>n-m</sub> – уровень статистической значимости различий между соответствующими группами сравнения

Активность каспазы-3 в интактных опухолевых клетках линии Jurkat была достоверно ниже в 2,96 раза (p<0,05) и в 6,13 раза (p<0,05) по сравнению с показателями в интактных лимфоцитах крови и лимфоцитах крови, инкубированных в присутствии 0,5 мМ пероксида водорода, соответственно (таблица 5). В интактных опухолевых клетках линии Jurkat было установлено достоверно значимое увеличение содержания NF-κB в 2,11 раза (p<0,05), Araf-1 – в 6,12 раза (p<0,05) и количества клеток со сниженным митохондриальным

потенциалом – в 2,02 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значениями данных показателей в интактных лимфоцитах крови (таблица 5, рисунок 18).

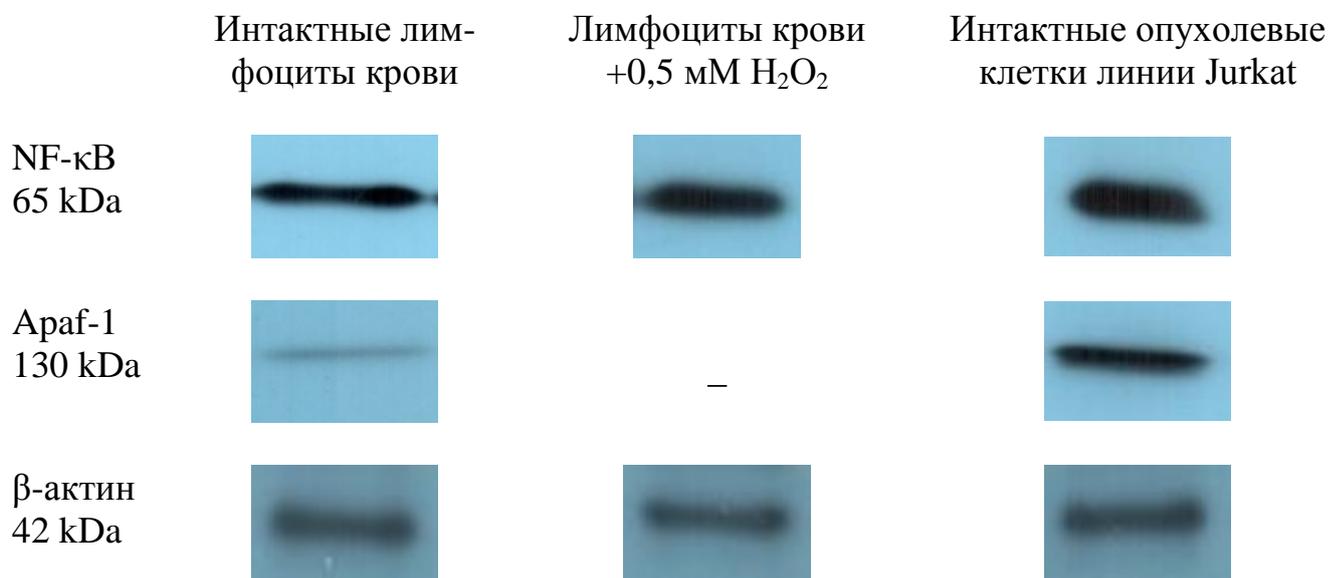


Рисунок 18 – Содержание NF-κB, Araf-1 и β-актина в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, интактных лимфоцитах крови и в условиях окислительного стресса *in vitro*, определенное с помощью вестерн-блотт анализа

Результаты проточной цитофлюориметрии показали, что количество TNF RI-положительных интактных опухолевых клеток линии Jurkat было сопоставимо с числом TNF RI-положительных интактных лимфоцитов крови, а количество интактных опухолевых клеток презентующих на своей поверхности Fas-рецепторы было, достоверно ниже в 2,43 раза ( $p < 0,05$ ), чем число Fas-положительных интактных лимфоцитов крови (таблица 6).

Таблица 6 – Количество Fas- и TNF RI-презентирующих интактных опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови, (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы		Содержание Fas-презентирующих клеток, %	Содержание TNF RI-презентирующих клеток, %
Интактные лимфоциты крови	1	10,45 (5,30-10,60)	9,20 (6,50-10,30)
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	2	4,30 (2,12-8,90) $p_{2-1} < 0,05$	9,56 (7,32-14,20)

В результате проведенного вестерн-блотт анализа было установлено, что содержание в интактных лимфоцитах крови Hsp27 составило 1,502 (1,453-1,520) у.е. и Hsp70 – 1,579 (1,566-1,600) у.е. (таблица 7).

При моделировании ОС *in vitro* в лимфоцитах крови концентрация Hsp27 составила 1,962 (1,922-2,012) у.е., что было достоверно выше в 1,31 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных лимфоцитах крови (таблица 7).

Таблица 7 – Содержание белков теплового шока (Hsp) 27 и 70 в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, интактных лимфоцитах крови и в условиях окислительного стресса *in vitro*, (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы		Содержание Hsp27, у.е.	Содержание Hsp70, у.е.
Интактные лимфоциты крови	1	1,502 (1,453-1,520)	1,579 (1,566-1,600)
Лимфоциты крови +0,5 мМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	1,962 (1,922-2,012) $p_{2-1} < 0,05$	–
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	3	2,890 (2,340-2,993) $p_{3-1} < 0,05$ ; $p_{3-2} < 0,05$	4,614 (4,416-4,710) $p_{3-1} < 0,05$

Кроме этого, нами было установлено, что содержание Hsp27 и Hsp70 было значительно выше в интактных опухолевых клетках линии Jurkat по сравнению с интактными лимфоцитами крови и в условиях моделирования ОС *in vitro*. Так, в интактных опухолевых клетках линии Jurkat было получено увеличение содержания Hsp27 в 1,92 раза ( $p < 0,05$ ), Hsp70 – в 2,92 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных лимфоцитах крови; кроме этого, было зафиксировано увеличение концентрации Hsp27 в 1,47 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значением данного показателя в лимфоцитах крови, инкубированных в присутствии 0,5 мМ пероксида водорода (таблица 7, рисунок 19). При сопоставлении полученных данных с результатами выживаемости опухолевых клеток линии Jurkat можно сделать заключение о том, что Hsp27 и Hsp70 играют антиапоптотическую роль при опухолевой прогрессии.

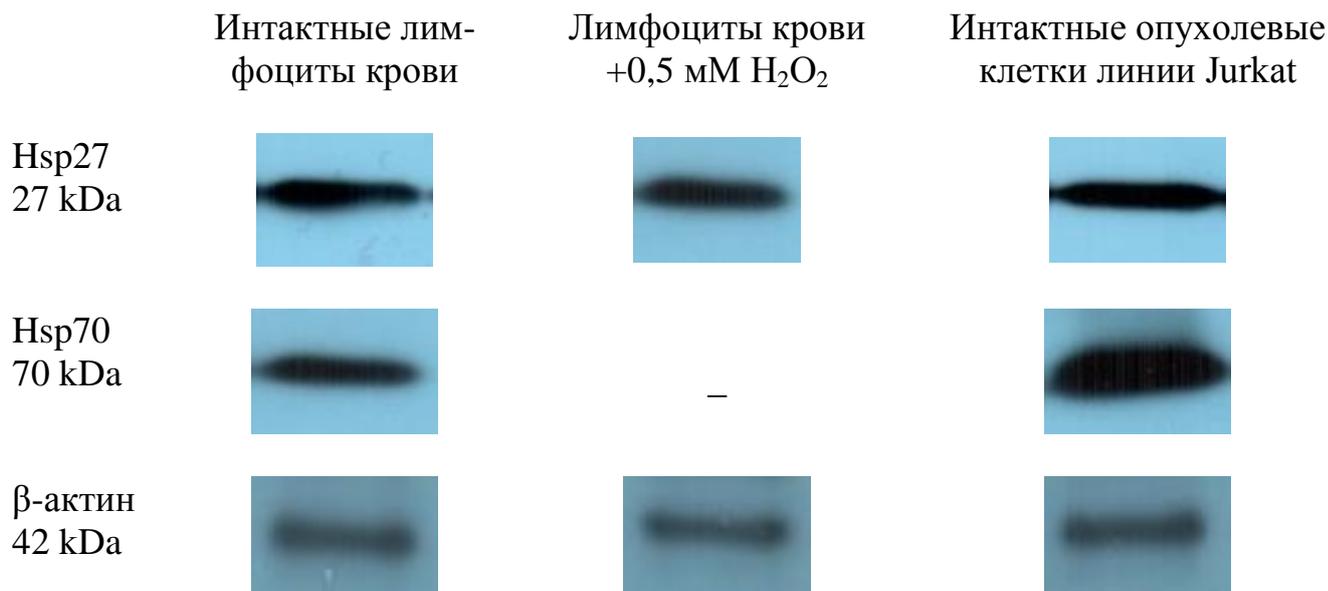


Рисунок 19 – Содержание белков теплового шока (Hsp) 27, 70 и β-актина в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, интактных лимфоцитах крови и в условиях окислительного стресса *in vitro*, определенное с помощью вестерн-блотт анализа

Таким образом, нами установлено эффективное «ускользание» опухолевых клеток линии Jurkat от запрограммированной гибели. Однако при моделировании ОС *in vitro* в лимфоцитах крови показано наличие как цитопротективного эффекта – увеличение концентрации NF-κB, так и завершенности апоптоза – активация каспазы-3.

При анализе полученных результатов, как в опухолевых клетках, так и в лимфоцитах крови в условиях моделирования ОС, нами зафиксировано увеличение содержания антиапоптотического фактора транскрипции NF-κB. Роль NF-κB в регуляции апоптоза не однозначна. С одной стороны, NF-κB способен активировать транскрипцию антиапоптотических генов, кодирующих белки Bcl-X<sub>L</sub>, XIAP, cIAP, с другой – он может прямо стимулировать экспрессию апоптозиндуцирующих генов, таких как Fas-рецептор, DR4 и DR5 [23, 492].

Исходя из этого, можно предположить, что ингибирование апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat опосредовано снижением уровня экспрессии

Fas-рецепторов на поверхности их мембраны, приводящее к снижению активности эффекторного белка апоптоза – каспазы-3.

### **3.3 Параметры реализации и регуляции апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat при различных условиях культивирования**

С целью расширения существующих представлений о регуляции апоптоза опухолевых клеток в настоящей работе в качестве методологического подхода применяли активацию запрограммированной гибели клеток с помощью дексаметазона. Апоптотическая гибель может реализовываться в результате различных экзогенных воздействий, опосредованных через рецепторный аппарат клетки. Одним из таких эффекторов является глюкокортикоид – DEX. Механизм действия данного гормона опосредуется через специфические внутриклеточные глюкокортикоидные рецепторы, регулируя при этом экспрессию генов, фазы клеточного цикла и содержание вторичных мессенджеров [150, 451, 490].

При добавлении DEX в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat было получено достоверно значимое увеличение количества аннексин-положительных клеток в 7,98 раза ( $p < 0,05$ ), клеток со сниженным митохондриальным потенциалом – в 3,22 раза ( $p < 0,05$ ), содержания проапоптотического фактора транскрипции Araf-1 – в 1,13 раза ( $p < 0,05$ ) и активности эффекторного фермента апоптоза каспазы-3 – в 3,99 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 5, 8).

Основываясь на том, что апоптоз протекает с участием цистеин-содержащих белковых молекул, большой интерес представляло изучение реализации и регуляции запрограммированной клеточной гибели опухолевых клеток линии Jurkat путем изменения их редокс-баланса с помощью блокатора SH-групп пептидов и белков – NEM и протектора SH-групп пептидов и протеинов – DTE.

Таблица 8 – Параметры, характеризующие реализацию и регуляцию апоптоза в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и в условиях культивирования с DEX и/или NEM, DTE, BSO, KRIBB3, (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы		Количество аннексин-положительных клеток, %	Количество клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, %	Активность каспазы-3, пмоль/мин×мг белка	Содержание NF-κB, у.е.	Содержание Araf-1, у.е.
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	1	5,20 (4,00-5,60)	18,00 (15,10-19,00)	36,58 (22,66-43,89)	3,106 (3,095-3,128)	1,884 (1,856-1,917)
Опухолевые клетки линии Jurkat, культивированные при добавлении	DEX	2 41,50 (35,30-42,10) p <sub>2-1</sub> <0,05	58,00 (54,10-62,90) p <sub>2-1</sub> <0,05	145,97 (132,26-148,69) p <sub>2-1</sub> <0,05	2,797 (2,672-2,815) p <sub>2-1</sub> <0,05	2,128 (2,115-2,225) p <sub>2-1</sub> <0,05
	NEM	3 52,10 (41,50-72,90) p <sub>3-1</sub> <0,05	92,60 (88,20-94,60) p <sub>3-1</sub> <0,05	178,22 (170,34-202,33) p <sub>3-1</sub> <0,05	5,999 (5,889-6,055) p <sub>3-1</sub> <0,05	3,708 (3,655-3,744) p <sub>3-1</sub> <0,05
	NEM+DEX	4 72,50 (60,20-77,70) p <sub>4-1</sub> <0,05; p <sub>4-2</sub> <0,05	91,15 (89,00-93,60) p <sub>4-1</sub> <0,05; p <sub>4-2</sub> <0,05	184,52 (165,23-188,39) p <sub>4-1</sub> <0,05; p <sub>4-2</sub> <0,05	6,101 (6,010-6,110) p <sub>4-1</sub> <0,05; p <sub>4-2</sub> <0,05	0,597 (0,556-0,665) p <sub>4-1</sub> <0,05; p <sub>4-2</sub> <0,05 p <sub>4-3</sub> <0,05
	DTE	5 53,90 (36,70-54,60) p <sub>5-1</sub> <0,05	84,30 (79,10-89,10) p <sub>5-1</sub> <0,05	123,45 (99,94-126,80) p <sub>5-1</sub> <0,05	4,473 (4,334-4,504) p <sub>5-1</sub> <0,05	1,519 (1,499-1,543) p <sub>5-1</sub> <0,05
	DTE+DEX	6 50,20 (43,70-61,80) p <sub>6-1</sub> <0,05	84,90 (82,50-86,90) p <sub>6-1</sub> <0,05; p <sub>6-2</sub> <0,05	162,34 (158,13-167,97) p <sub>6-1</sub> <0,05; p <sub>6-5</sub> <0,05	0,318 (0,299-0,344) p <sub>6-1</sub> <0,05; p <sub>6-2</sub> <0,05 p <sub>6-5</sub> <0,05	0,985 (0,972-1,009) p <sub>6-1</sub> <0,05; p <sub>6-2</sub> <0,05 p <sub>6-5</sub> <0,05
	BSO	7 45,90 (37,50-67,10) p <sub>7-1</sub> <0,05	67,20 (63,90-71,40) p <sub>7-1</sub> <0,05	134,22 (129,45-140,24) p <sub>7-1</sub> <0,05	6,104 (6,055-6,131) p <sub>7-1</sub> <0,05	1,007 (0,988-1,110) p <sub>7-1</sub> <0,05
	BSO+DEX	8 72,60 (64,20-74,50) p <sub>8-1</sub> <0,05; p <sub>8-2</sub> <0,05	75,75 (63,60-80,00) p <sub>8-1</sub> <0,05	130,85 (120,95-141,23) p <sub>8-1</sub> <0,05	6,096 (5,994-6,120) p <sub>8-1</sub> <0,05; p <sub>8-2</sub> <0,05	0,976 (0,968-1,023) p <sub>8-1</sub> <0,05; p <sub>8-2</sub> <0,05
	KRIBB3	9 61,80 (39,30-69,30) p <sub>9-1</sub> <0,05	55,65 (52,90-56,00) p <sub>9-1</sub> <0,05	90,33 (80,87-98,40) p <sub>9-1</sub> <0,05	3,604 (3,535-3,654) p <sub>9-1</sub> <0,05	0,659 (0,553-0,668) p <sub>9-1</sub> <0,05
	KRIBB3+DEX	10 60,60 (59,20-68,70) p <sub>10-1</sub> <0,05; p <sub>10-2</sub> <0,05	54,45 (51,90-59,80) p <sub>10-1</sub> <0,05	116,93 (103,22-125,01) p <sub>10-1</sub> <0,05; p <sub>10-9</sub> <0,05	4,084 (3,980-4,160) p <sub>10-1</sub> <0,05; p <sub>10-2</sub> <0,05	1,006 (0,969-1,056) p <sub>10-1</sub> <0,05; p <sub>10-2</sub> <0,05 p <sub>10-9</sub> <0,05

Примечание – Здесь и в таблицах 9, 10, 12, 18: p<sub>n-m</sub> – уровень статистической значимости различий между соответствующими группами сравнения; DEX – дексаметазон, NEM – N-этилмалеимид, DTE – 1,4-дителиоэритритол, BSO – бутионин-сульфоксимин, KRIBB3 – 5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол

При блокировании SH-групп пептидов и белков в опухолевых клетках линии Jurkat с помощью внесения в среду культивирования NEM было получено достоверно значимое увеличение количества аннексин-положительных клеток в 10,02 раза ( $p < 0,05$ ), клеток со сниженным митохондриальным потенциалом – в 5,14 раза ( $p < 0,05$ ), содержания Araf-1 – в 1,97 раза ( $p < 0,05$ ), NF-κB – в 1,93 раза ( $p < 0,05$ ) и активности каспазы-3 – в 4,87 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактной культуре опухолевых клеток (таблицы 5, 8). Одновременное внесение DEX и NEM в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым увеличением количества аннексин-положительных клеток в 13,94 раза ( $p < 0,05$ ) и в 1,75 раза ( $p < 0,05$ ), клеток со сниженным митохондриальным потенциалом – в 5,06 раза ( $p < 0,05$ ) и 1,57 раза ( $p < 0,05$ ), содержания NF-κB – в 1,96 раза ( $p < 0,05$ ) и в 2,18 раза ( $p < 0,05$ ), активности каспазы-3 – в 5,04 раза ( $p < 0,05$ ) и 1,26 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения концентрации Araf-1 в 3,16 раза ( $p < 0,05$ ) и в 3,56 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значений, полученных в интактных опухолевых клетках и опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX, соответственно (таблицы 5, 8). Однако, культивирование опухолевых клеток линии Jurkat в присутствии DEX и NEM позволило установить достоверно значимое снижение содержания Araf-1 в 6,21 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателем в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только NEM (таблица 8).

При протекции SH-групп пептидов и белков в опухолевых клетках линии Jurkat с помощью добавления в среду культивирования DTE было получено достоверно значимое увеличение количества аннексин-положительных клеток в 10,37 раза ( $p < 0,05$ ), клеток со сниженным митохондриальным потенциалом – в 4,68 раза ( $p < 0,05$ ), содержания NF-κB – в 1,44 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне активации каспазы-3 в 3,37 раза ( $p < 0,05$ ) и снижения концентрации Araf-1 в 1,24 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 5, 8). Внесение DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с DTE, сопровождалось достоверно значимым увеличением количества

аннексин-положительных клеток в 9,65 раза ( $p < 0,05$ ), клеток со сниженным митохондриальным потенциалом – в 4,72 раза ( $p < 0,05$ ), активности каспазы-3 – в 4,44 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения содержания NF-κB в 9,77 раза ( $p < 0,05$ ) и Araf-1 – в 1,91 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значениями в интактных опухолевых клетках; кроме этого, нами было получено достоверно значимое увеличение количества клеток со сниженным митохондриальным потенциалом в 1,46 раза ( $p < 0,05$ ), снижение содержания NF-κB в 8,80 раза ( $p < 0,05$ ) и Araf-1 – в 2,16 раза ( $p < 0,05$ ) относительно показателей в опухолевых клетках, культивированных при добавлении только DEX (таблицы 5, 8). Также, в опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных в присутствии DEX и DTE, было установлено достоверно значимое увеличение активности каспазы-3 в 1,32 раза ( $p < 0,05$ ), снижение концентрации NF-κB в 14,07 раза ( $p < 0,05$ ) и Araf-1 – в 1,54 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значениями в опухолевых клетках, культивированных при добавлении только DTE (таблица 8).

С целью расширения фундаментальных знаний о роли системы глутатиона в регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat в настоящей работе применялся ингибитор ключевого фермента синтеза трипептида *de novo* – γ-глутамилцистеинсинтетазы – BSO.

Так, добавление в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat BSO сопровождалось достоверно значимым увеличением количества аннексин-положительных клеток в 8,83 раза ( $p < 0,05$ ), клеток со сниженным митохондриальным потенциалом – в 3,73 раза ( $p < 0,05$ ), содержания NF-κB – в 1,97 раза ( $p < 0,05$ ) и активности каспазы-3 – в 3,67 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения концентрации Araf-1 в 1,87 раза ( $p < 0,05$ ), по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 5, 8). Одновременное внесение DEX и BSO в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat позволило установить достоверно значимое увеличение количества аннексин-положительных клеток в 13,96 раза ( $p < 0,05$ ), клеток со сниженным митохондриальным потенциалом – в 4,21 раза ( $p < 0,05$ ), содержания NF-κB – в

1,96 раза ( $p < 0,05$ ), активности каспазы-3 – в 3,58 раза ( $p < 0,05$ ) и снижение концентрации Araf-1 в 1,93 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами, полученными в интактной культуре опухолевых клеток; кроме этого, нами было установлено достоверно значимое увеличение количества аннексин-положительных клеток в 1,75 раза ( $p < 0,05$ ) и содержания NF-κB – в 2,18 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения концентрации Araf-1 в 2,18 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значений, полученных в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 5, 8).

Применение KRIBB3 позволило установить молекулярные механизмы участия Hsp27 в процессе реализации и регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.

При внесении KRIBB3 в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat нами было получено достоверно значимое увеличение количества аннексин-положительных клеток в 11,88 раза ( $p < 0,05$ ), клеток со сниженным митохондриальным потенциалом – в 3,09 раза ( $p < 0,05$ ), содержания NF-κB – в 1,16 раза ( $p < 0,05$ ) и активности каспазы-3 – в 2,47 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения концентрации Araf-1 в 2,86 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 5, 8). Внесение DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с KRIBB3, сопровождалось достоверно значимым увеличением количества аннексин-положительных клеток в 11,65 раза ( $p < 0,05$ ), клеток со сниженным митохондриальным потенциалом – в 3,03 раза ( $p < 0,05$ ), содержания NF-κB – в 1,31 раза ( $p < 0,05$ ) и активности каспазы-3 – в 3,20 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения концентрации Araf-1 в 1,87 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значениями в интактных опухолевых клетках; кроме этого, нами было установлено достоверно значимое увеличение количества аннексин-положительных клеток в 1,46 раза ( $p < 0,05$ ) и содержания NF-κB – в 1,46 раза ( $p < 0,05$ ), снижение концентрации Araf-1 в 2,12 раза ( $p < 0,05$ ) относительно показателей, полученных в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 5, 8). Также, в опухолевых клетках

линии Jurkat, культивированных в присутствии DEX и KRIBB3, было зафиксировано достоверно значимое увеличение содержания Araf-1 в 1,53 раза ( $p < 0,05$ ) и активности каспазы-3 – в 1,29 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только KRIBB3 (таблица 8).

Рецептор является первичной мишенью для воздействия лигандов. В формировании клеточного ответа важную роль играет механизм передачи внешнего сигнала, генерируемого рецептором, включение внутриклеточных посредников [4, 158, 407, 496]. Презентация рецепторов на плазматической мембране клетки осуществляется путем формирования уникальной укладки гидрофобной части белковой молекулы рецептора при участии шаперонов и функциональных групп полипептидной цепи протеина [29]. В связи с этим мы провели *in vitro* оценку содержания Fas- и TNF RI-положительных опухолевых клеток линии Jurkat в условиях индукции апоптоза и/или изменения редокс-статуса клеток, а также ингибирования Hsp27, синтеза глутатиона *de novo*.

Добавление DEX в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым повышением экспрессии Fas-рецептора в 7,00 раза ( $p < 0,05$ ) и TNF RI – в 2,98 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактной культуре опухолевых клеток (таблицы 6, 9).

При блокировании SH-групп пептидов и белков в опухолевых клетках линии Jurkat с помощью внесения в среду культивирования NEM нами было получено достоверно значимое увеличение количества Fas-положительных клеток в 18,22 раза ( $p < 0,05$ ) и TNF RI-положительных клеток – в 6,42 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 6, 9). Добавление DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с NEM, позволило установить достоверно значимое увеличение процента Fas-положительных клеток в 21,60 раза ( $p < 0,05$ ) и в 3,09 раза ( $p < 0,05$ ); TNF RI-положительных клеток – в 8,29 раза ( $p < 0,05$ ) и в 2,79 раза ( $p < 0,05$ ), соответственно, по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках и

опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 6, 9). Также, в опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных в присутствии DEX и NEM, было зарегистрировано достоверно значимое увеличение содержания Fas-положительных клеток в 1,19 раза ( $p < 0,05$ ) и TNF RI-положительных клеток – в 1,29 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только NEM (таблица 9).

Таблица 9 – Количество Fas- и TNF RI-презентирующих интактных опухолевых клеток линии Jurkat и в условиях культивирования с DEX и/или NEM, DTE, BSO, KRIBB3, (Me ( $Q_1$ - $Q_3$ ))

Группы			Содержание Fas-презентирующих клеток, %	Содержание TNF RI-презентирующих клеток, %
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat		1	4,30 (2,12-8,90)	9,56 (7,32-14,20)
Опухолевые клетки линии Jurkat, культивированные при добавлении	DEX	2	30,10 (27,90-38,80) $p_{2-1} < 0,05$	28,45 (22,30-32,10) $p_{2-1} < 0,05$
	NEM	3	78,35 (69,50-79,00) $p_{3-1} < 0,05$	61,40 (59,00-64,90) $p_{3-1} < 0,05$
	NEM+DEX	4	92,90 (90,00-99,50) $p_{4-1} < 0,05$ ; $p_{4-2} < 0,05$ $p_{4-3} < 0,05$	79,25 (77,90-80,50) $p_{4-1} < 0,05$ ; $p_{4-2} < 0,05$ $p_{4-3} < 0,05$
	DTE	5	21,55 (14,80-30,20) $p_{5-1} < 0,05$	14,95 (12,50-15,30)
	DTE+DEX	6	57,70 (55,00-67,30) $p_{6-1} < 0,05$ ; $p_{6-2} < 0,05$ $p_{6-5} < 0,05$	30,65 (25,30-34,00) $p_{6-1} < 0,05$ ; $p_{6-5} < 0,05$
	BSO	7	78,93 (77,50-87,21) $p_{7-1} < 0,05$	55,44 (52,70-70,00) $p_{7-1} < 0,05$
	BSO+DEX	8	95,20 (82,00-96,80) $p_{8-1} < 0,05$ ; $p_{8-2} < 0,05$	63,20 (58,00-68,20) $p_{8-1} < 0,05$ ; $p_{8-2} < 0,05$
	KRIBB3	9	81,30 (79,80-84,40) $p_{9-1} < 0,05$	64,65 (58,30-71,00) $p_{9-1} < 0,05$
	KRIBB3+DEX	10	79,30 (77,30-81,50) $p_{10-1} < 0,05$ ; $p_{10-2} < 0,05$	64,70 (61,30-74,50) $p_{10-1} < 0,05$ ; $p_{10-2} < 0,05$

Протекция SH-групп пептидов и белков в опухолевых клетках линии Jurkat с помощью добавления в среду культивирования DTE сопровождалась достоверно значимым увеличением количества Fas-положительных клеток в 5,01

раза ( $p < 0,05$ ) и сопоставимым числом TNF RI-положительных клеток по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 6, 9). Одновременное внесение DEX и DTE в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat позволило установить достоверно значимое увеличение количества Fas-положительных клеток в 13,42 раза ( $p < 0,05$ ) и TNF RI-положительных клеток – в 3,21 раза ( $p < 0,05$ ), относительно значений в интактной культуре опухолевых клеток; кроме этого, нами было установлено достоверно значимое увеличение содержания Fas-положительных клеток в 1,92 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 6, 9). Также, в опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных при внесении DEX и DTE, было зафиксировано достоверно значимое увеличение содержания Fas-положительных клеток в 2,68 раза ( $p < 0,05$ ) и TNF RI-положительных клеток – в 2,05 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DTE (таблица 9).

При ингибировании синтеза глутатиона *de novo* в опухолевых клетках линии Jurkat с помощью добавления в среду культивирования BSO было получено достоверно значимое увеличение количества Fas-положительных клеток в 18,36 раза ( $p < 0,05$ ) и TNF RI-положительных клеток – в 5,80 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 6, 9). Внесение DEX в культивирования среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с BSO, сопровождалось достоверно значимым увеличением количества Fas-положительных клеток в 22,14 раза ( $p < 0,05$ ) и в 3,16 раза ( $p < 0,05$ ), TNF RI-положительных клеток – в 6,61 раза ( $p < 0,05$ ) и в 2,22 раза ( $p < 0,05$ ), соответственно, по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках и опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 6, 9).

Действие ингибитора Hsp27 в опухолевых клетках линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым увеличением количества Fas-

положительных клеток в 18,91 раза ( $p < 0,05$ ) и TNF RI-положительных клеток – в 6,76 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 6, 9). Внесение DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с KRIBB3, позволило установить достоверно значимое увеличение количества Fas-положительных клеток в 18,44 раза ( $p < 0,05$ ) и в 2,63 раза ( $p < 0,05$ ), TNF RI-положительных клеток – в 6,77 раза ( $p < 0,05$ ) и в 2,27 раза ( $p < 0,05$ ) относительно показателей в интактных опухолевых клетках и опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX, соответственно (таблицы 6, 9).

Выявленное нами повышение уровня Hsp27 и Hsp70 в опухолевых клетках линии Jurkat может быть связано с процессами, позволяющими «ускользнуть» этим клеткам от запрограммированной гибели, которые возникли в качестве компенсаторно-приспособительных реакций на различные изменения в окружающей среде. Поэтому выяснение механизмов изменения содержания Hsp27 и Hsp70 под действием тех или иных факторов и сопоставление полученных результатов с показателями активности и содержания компонентов тиолдисульфидной системы, уровнем ОМБ и их деградации, выживаемости опухолевых клеток линии Jurkat позволит установить роль Hsp27 и Hsp70 в поддержании редокс-баланса клетки, рефолдинге белков и дизрегуляции апоптоза. В данном разделе представлены результаты, отражающие участие индуктора апоптоза, редокс-статуса клетки, системы глутатиона в функционировании Hsp27 и Hsp70 в опухолевых клетках линии Jurkat.

При добавлении DEX в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat было получено достоверно значимое снижение содержания Hsp27 в 1,34 раза ( $p < 0,05$ ) и Hsp70 – в 1,92 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 7, 10).

Действие NEM в опухолевых клетках линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым снижением содержания Hsp27 в 2,18 раза ( $p < 0,05$ ) и Hsp70

– в 2,18 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значениями данных показателей в интактных опухолевых клетках (таблицы 7, 10).

Таблица 10 – Содержание белков теплового шока (Hsp) 27 и 70 в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и в условиях культивирования с DEX и/или NEM, DTE, BSO, KRIBB3, (Me ( $Q_1$ - $Q_3$ ))

Группы			Содержание Hsp27, у.е.	Содержание Hsp70, у.е.
Интактные	опухолевые	1	2,890 (2,340-2,993)	4,614 (4,416-4,710)
Опухолевые клетки линии Jurkat, культивированные при добавлении	DEX	2	2,150 (2,115-2,309) $p_{2-1} < 0,05$	2,400 (2,367-2,441) $p_{2-1} < 0,05$
	NEM	3	1,325 (1,301-1,445) $p_{3-1} < 0,05$	2,119 (1,995-2,195) $p_{3-1} < 0,05$
	NEM+DEX	4	5,601 (5,336-5,911) $p_{4-1} < 0,05$ ; $p_{4-2} < 0,05$ $p_{4-3} < 0,05$	1,940 (1,870-1,995) $p_{4-1} < 0,05$ ; $p_{4-2} < 0,05$
	DTE	5	5,829 (5,705-5,924) $p_{5-1} < 0,05$	1,694 (1,658-1,705) $p_{5-1} < 0,05$
	DTE+DEX	6	1,504 (1,478-1,625) $p_{6-1} < 0,05$ ; $p_{6-2} < 0,05$ $p_{6-5} < 0,05$	1,702 (1,682-1,705) $p_{6-1} < 0,05$ ; $p_{6-2} < 0,05$
	BSO	7	2,828 (2,669-2,940)	2,378 (2,229-2,400) $p_{7-1} < 0,05$
	BSO+DEX	8	5,902 (5,897-6,000) $p_{8-1} < 0,05$ ; $p_{8-2} < 0,05$ $p_{8-7} < 0,05$	2,030 (1,964-2,060) $p_{8-1} < 0,05$
	KRIBB3	9	1,370 (1,299-1,451) $p_{9-1} < 0,05$	4,789 (4,690-4,889)
	KRIBB3+DEX	10	3,062 (2,890-3,209) $p_{10-2} < 0,05$ ; $p_{10-9} < 0,05$	4,888 (4,779-4,897) $p_{10-2} < 0,05$

Одновременное добавление DEX и NEM в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat позволило нам установить достоверно значимое увеличение содержания Hsp27 в 1,94 раза ( $p < 0,05$ ) и в 2,61 раза ( $p < 0,05$ ), снижение концентрации Hsp70 в 2,38 раза ( $p < 0,05$ ) и в 1,24 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значений в интактных опухолевых клетках и опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX, соответственно (таблицы 7, 10). Помимо этого, в опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных при

добавлении DEX и NEM, нами было выявлено достоверно значимое увеличение содержания Hsp27 в 4,23 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значением данного параметра в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только NEM (таблица 10).

При протекции SH-групп пептидов и белков в опухолевых клетках линии Jurkat с помощью добавления в среду культивирования DTE нами было получено достоверно значимое увеличение содержания Hsp27 в 2,02 раза ( $p < 0,05$ ) и снижение концентрации Hsp70 – в 2,72 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактной опухолевой культуре клеток (таблицы 7, 10). Внесение DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с DTE, сопровождалось достоверно значимым снижением содержания Hsp27 в 1,92 раза ( $p < 0,05$ ) и в 1,43 раза ( $p < 0,05$ ); Hsp70 в 2,71 раза ( $p < 0,05$ ) и в 1,41 раза ( $p < 0,05$ ), соответственно, по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках и опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 7, 10). Также, в опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных в присутствии DEX и DTE, было установлено достоверно значимое снижение содержания Hsp27 в 3,88 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателем в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DTE (таблица 10).

Добавление BSO в среду культивирования в опухолевых клетках линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым снижением содержания Hsp70 в 1,94 раза ( $p < 0,05$ ) и сопоставимыми значениями концентрации Hsp27 по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 7, 10). Одновременное внесение DEX и BSO в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat позволило установить достоверно значимое увеличение содержания Hsp27 в 2,04 раза ( $p < 0,05$ ) и снижение концентрации Hsp70 в 2,27 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках; кроме этого, нами было установлено достоверно значимое увеличение содержания Hsp27 в 2,75 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значения в опухолевых клетках, культивированных при добавлении только DEX (таблицы 7, 10). Также, в опухолевых клетках линии

Jurkat, культивированных в присутствии DEX и BSO, было зарегистрировано достоверно значимое увеличение концентрации Hsp27 в 2,09 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значениями показателя в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только BSO (таблица 10).

При ингибировании Hsp27 в опухолевых клетках линии Jurkat с помощью добавления в среду культивирования KRIBB3 нами было получено достоверно значимое снижение содержания Hsp27 в 2,11 раза ( $p < 0,05$ ) и сопоставимые значения Hsp70 по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 7, 10). Добавление DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с KRIBB3, сопровождалось достоверно значимым увеличением содержания Hsp27 в 1,42 раза ( $p < 0,05$ ) и концентрации Hsp70 – в 2,04 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблица 10). Помимо этого, в опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных при одновременном добавлении DEX и KRIBB3, было установлено достоверно значимое увеличение содержания Hsp27 в 2,24 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значения в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только KRIBB3 (таблица 10).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об усилении проведения апоптотического сигнала по рецептор-опосредованному пути и согласуются с увеличением процента опухолевых клеток линии Jurkat, вступивших в апоптоз, при изменении редокс-статуса и ингибировании Hsp27 *in vitro*. При этом регистрировалась завершенная реализация апоптоза в исследуемых клетках, сопровождающаяся активацией эффекторной каспазы-3. Но, необходимо отметить наличие разнонаправленных изменений в содержании антиапоптотического (NF-κB) и проапоптотического (Araf-1) факторов транскрипции в изучаемых клетках при изменении редокс-статуса и ингибировании Hsp27 *in vitro*. Причем, ингибирование синтеза глутатиона *de novo* или блокирование SH-групп пептидов и протеинов при одновременной индукции апоптоза с помощью DEX, а также действие протектора SH-групп пептидов и

белков в опухолевых клетках линии Jurkat сопровождались резким увеличением содержания Hsp27 и снижением концентрации Hsp70. Однако действие ингибитора Hsp27 не влияло на содержание Hsp70 в опухолевых клетках линии Jurkat.

Вероятнее всего, компоненты тиолдисульфидной системы, ОМБ и их деградация вносили существенный вклад в молекулярные механизмы запуска и регуляции программированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat при различных условиях культивирования.

### **3.4 Оценка окислительного стресса в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови**

В настоящее время активные кислородные метаболиты рассматриваются как универсальный инструмент опухолевой трансформации, который способен вызвать спонтанный и индуцированный физическими и/или химическими факторами канцерогенез [306, 478].

В интактных лимфоцитах крови содержание АФК составило 0,105 (0,099-0,122) у.е., а гидроксильного радикала – 46,17 (36,31-55,04) нмоль/мг белка (таблица 11).

При моделировании ОС *in vitro* в лимфоцитах крови концентрация АФК составила 0,714 (0,570-1,922) у.е., гидроксильного радикала – 130,67 (118,09-149,73) нмоль/мг белка, что было достоверно выше в 6,80 раза ( $p < 0,05$ ) и в 2,83 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных лимфоцитах крови (таблица 11).

Также было установлено, что в интактных опухолевых клетках линии Jurkat содержание АФК было достоверно выше в 6,19 раза ( $p < 0,05$ ) и гидроксильного радикала – в 11,33 раза ( $p < 0,05$ ), чем в интактных лимфоцитах крови (таблица 11). Содержание гидроксильного радикала в интактных

опухолевых клетках линии Jurkat было выше достоверно в 4,00 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателем в лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro* (таблица 11).

Таблица 11 – Параметры, характеризующие уровень окислительного стресса в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, интактных лимфоцитах крови и в условиях окислительного стресса *in vitro*, (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы		Концентрация активных форм кислорода, у.е.	Содержание гидроксильного радикала, нмоль/мг белка
Интактные лимфоциты крови	1	0,105 (0,099-0,122)	46,17 (36,31-55,04)
Лимфоциты крови +0,5 мМ Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub>	2	0,714 (0,570-1,922) $p_{2-1} < 0,05$	130,67 (118,09-149,73) $p_{2-1} < 0,05$
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	3	0,650 (0,491-1,980) $p_{3-1} < 0,05$	523,00 (415,10-719,37) $p_{3-1} < 0,05$ ; $p_{3-2} < 0,05$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что усиленная генерация АФК является неотъемлемой частью опухолевой трансформации. Но, несмотря на выраженную продукцию АФК, опухолевая клетка характеризуется устойчивостью к условиям ОС, что позволяет ей успешно выживать.

### **3.5 Оценка окислительного стресса в опухолевых клетках линии Jurkat при различных условиях культивирования**

Исследования последних лет указывают на то, что большинство патологических процессов, в том числе и опухолевый рост, сопровождаются нарушением интрацеллюлярного редокс-баланса [197, 273, 502]. В связи с этим нами была поставлена задача более детально изучить уровень АФК в опухолевых клетках линии Jurkat при внесении в среду культивирования индуктора апоптоза и/или редокс-модуляторов, а также ингибитора Hsp27.

Действие индуктора апоптоза DEX в опухолевых клетках линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым увеличением содержания гидроксильного радикала – в 3,23 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактной опухолевой культуре клеток (таблицы 11, 12).

Таблица 12 – Параметры, характеризующие уровень окислительного стресса в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и в условиях культивирования с DEX и/или NEM, DTE, BSO, KRIBB3, (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы		Концентрация активных форм кислорода, у.е.	Содержание гидроксильного радикала, нмоль/мг белка
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat		1	0,650 (0,491-1,980) 523,00 (415,10-719,37)
Опухолевые клетки линии Jurkat, культивируемые при добавлении	DEX	2	1,105 (0,847-1,564) 1688,63 (1577,64-1848,49) p <sub>2-1</sub> <0,05
	NEM	3	1,137 (0,899-1,268) 1729,17 (1096,83-2145,12) p <sub>3-1</sub> <0,05
	NEM+DEX	4	0,935 (0,854-1,082) 1837,34 (1778,05-2956,07) p <sub>4-1</sub> <0,05
	DTE	5	0,475 (0,365-0,635) 455,60 (352,56-471,22)
	DTE+DEX	6	0,914 (0,626-0,938) 825,25 (721,45-870,73) p <sub>6-5</sub> <0,05 p <sub>6-1</sub> <0,05; p <sub>6-2</sub> <0,05; p <sub>6-5</sub> <0,05
	BSO	7	1,087 (0,780-1,765) 752,55 (715,60-1033,80) p <sub>7-1</sub> <0,05
	BSO+DEX	8	0,960 (0,805-1,497) 854,40 (723,50-1403,35) p <sub>8-1</sub> <0,05; p <sub>8-2</sub> <0,05
	KRIBB3	9	1,439 (1,357-2,133) 2140,79 (1830,3-2569,76) p <sub>9-1</sub> <0,05
	KRIBB3+DEX	10	1,494 (1,355-2,148) 2884,12 (2011,45-3002,14) p <sub>10-1</sub> <0,05; p <sub>10-2</sub> <0,05

При блокировании SH-групп пептидов и белков в опухолевых клетках линии Jurkat с помощью добавления в среду культивирования NEM нами было получено достоверно значимое увеличение содержания гидроксильного радикала в 3,31 раза ( $p < 0,05$ ), внесение DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с NEM, сопровождалось увеличением показателя в 3,51 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 11, 12).

Присутствие DEX в культуральной среде опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с DTE, сопровождалось достоверно значимым увеличением содержания гидроксильного радикала в 1,58 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках; кроме этого, нами было отмечено достоверно

значимое снижение концентрации гидроксильного радикала в 2,05 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значения в опухолевых клетках, культивированных при добавлении только DEX (таблицы 11, 12). Также, в опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных при добавлении DEX и DTE, было установлено достоверно значимое увеличение содержания АФК в 1,92 раза ( $p < 0,05$ ) и гидроксильного радикала – в 1,81 раза ( $p < 0,05$ ) относительно показателей, полученных в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DTE (таблица 12).

При ингибировании синтеза глутатиона *de novo* в опухолевых клетках линии Jurkat с помощью добавления в среду культивирования BSO нами было получено достоверно значимое увеличение содержания гидроксильного радикала в 1,44 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 11, 12). Внесение DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с BSO, сопровождалось достоверно значимым увеличением содержания гидроксильного радикала в 1,63 раза ( $p < 0,05$ ) относительно результатов в интактных опухолевых клетках; также, нами было отмечено достоверно значимое снижение концентрации гидроксильного радикала в 1,98 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значением в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 11, 12).

Дополнительное внесение KRIBB3 в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым увеличением содержания гидроксильного радикала в 4,09 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 11, 12). При одновременном добавлении в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat DEX и KRIBB3 нами было установлено достоверно значимое увеличение содержания гидроксильного радикала в 5,51 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами, полученными в интактных опухолевых клетках; кроме этого, нами было зафиксировано достоверно значимое увеличение концентрации гидроксильного радикала в 1,71 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значения,

полученного в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 11, 12).

В опухолевых клетках линии Jurkat, при добавлении в среду культивирования DEX и/или NEM, DTE, BSO, KRIBB3 нами были получены сопоставимые значения содержания АФК по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках (таблица 12).

Таким образом, действие индуктора апоптоза и/или блокатора SH-групп пептидов и протеинов, а также ингибитора Hsp27, синтеза глутатиона *de novo* приводило к интенсивной наработке гидроксильного радикала в опухолевых клетках линии Jurkat. Однако при протекции SH-групп пептидов и белков в опухолевых клетках линии Jurkat не происходило увеличения содержания АФК и гидроксильного радикала, что косвенно доказывает участие SH-групп протеинов в качестве эффективных «молекул-ловушек» свободных радикалов.

### **3.6 Состояние тиолдисульфидной системы в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови**

Редокс-зависимые процессы в значительной степени влияют на функциональную активность многих белков, участвующих в регуляции важнейших для жизнедеятельности клетки процессах. Вследствие активной наработки АФК и формирования ОС в опухолевых клетках линии Jurkat нам представилось целесообразным исследовать и сопоставить изменения активности ферментативных и содержания неферментативных компонентов антиоксидантной системы в лимфоцитах крови и опухолевых клетках линии Jurkat.

Важным показателем редокс-состояния клетки служит величина соотношения GSH/GSSG [19, 126, 283]. Сдвиги этого показателя прямо отражают степень выраженности изменений редокс-статуса клетки, так как концентрация GSH в сотни раз превышает содержание компонентов других редокс-систем [27, 95]. В настоящее время GSH и GSSG относят к модуляторам трансдукции

внутриклеточного сигналинга, контролирующего пролиферацию и гибель клеток [248, 256]. Содержание в интактных лимфоцитах крови GSH составило 0,747 (0,741-0,880) нмоль/мг белка, GSSG – 0,110 (0,099-0,114) нмоль/мг белка, а величина соотношения GSH/GSSG была равной 7,165 (6,517-8,000) (таблица 13). Активность ГР в интактных лимфоцитах крови составила 312,80 (287,08-321,70) нмоль/мин×мг белка, ТРР – 4,44 (3,02-5,12) нмоль/мин×мг белка, а ГПО – 5,68 (5,06-7,00) мкмоль/мин×мг белка (таблица 13).

Таблица 13 – Показатели тиолдисульфидной системы в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, интактных лимфоцитах крови и в условиях окислительного стресса *in vitro*, (Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы		Содержание GSH, нмоль/мг белка	Содержание GSSG, нмоль/мг белка	Величина соотношения GSH/GSSG	Активность ГР, нмоль/мин×мг белка	Активность ТРР, нмоль/мин×мг белка	Активность ГПО, мкмоль/мин×мг белка
Интактные лимфоциты крови	1	0,747 (0,741-0,880)	0,110 (0,099-0,114)	7,165 (6,517-8,000)	312,80 (287,08-321,70)	4,44 (3,02-5,12)	5,68 (5,06-7,00)
Лимфоциты крови +0,5 мМ Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub>	2	2,084 (1,523-2,160) p <sub>2-1</sub> <0,05	0,168 (0,152-0,169) p <sub>2-1</sub> <0,05	12,410 (10,714-12,781) p <sub>2-1</sub> <0,05	277,56 (213,36-353,95)	7,79 (6,24-9,38) p <sub>2-1</sub> <0,05	9,28 (7,95-10,22) p <sub>2-1</sub> <0,05
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	3	2,051 (1,927-2,314) p <sub>3-1</sub> <0,05	0,164 (0,150-0,190) p <sub>3-1</sub> <0,05	13,140 (11,361-14,230) p <sub>3-1</sub> <0,05	119,45 (96,30-162,74) p <sub>3-1</sub> <0,05 p <sub>3-2</sub> <0,05	20,31 (16,25-24,37) p <sub>3-1</sub> <0,05 p <sub>3-2</sub> <0,05	10,54 (8,18-12,20) p <sub>3-1</sub> <0,05

Примечание – p<sub>n-m</sub> – уровень статистической значимости различий между соответствующими группами сравнения, GSH – восстановленный глутатион, GSSG – окисленный глутатион, ГР – глутатионредуктаза, ТРР – тиоредоксинредуктаза, ГПО – глутатионпероксидаза

При моделировании ОС *in vitro* в лимфоцитах крови концентрация GSH составила 2,084 (1,523-2,160) нмоль/мг белка, GSSG – 0,168 (0,152-0,169) нмоль/мг белка, а величина соотношения GSH/GSSG – 12,410 (10,714-12,781), что было достоверно выше в 2,79 раза (p<0,05), в 1,53 раза (p<0,05) и в 1,73 раза

( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных лимфоцитах крови, соответственно (таблица 13). Активность ГР при моделировании ОС *in vitro* в лимфоцитах крови составила 277,56 (213,36-353,95) нмоль/мин×мг белка и была сопоставима с показателем в интактных лимфоцитах крови (таблица 13). Активность ТРР в условиях моделирования ОС *in vitro* в лимфоцитах крови была равной 7,79 (6,24-9,38) нмоль/мин×мг белка, а ГПО – 9,28 (7,95-10,22) мкмоль/мин×мг белка, что было достоверно выше в 1,75 раза ( $p < 0,05$ ) и в 1,63 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных лимфоцитах крови, соответственно (таблица 13).

Содержание GSH в интактных опухолевых клетках линии Jurkat составило 2,051 (1,927-2,314) нмоль/мг белка, GSSG – 0,164 (0,150-0,190) нмоль/мг белка, величина соотношения GSH/GSSG была равной 13,140 (11,361-14,230), что было достоверно выше в 2,75 раза ( $p < 0,05$ ), в 1,49 раза ( $p < 0,05$ ) и в 1,83 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных лимфоцитах крови, соответственно (таблица 13). В интактных опухолевых клетках линии Jurkat активность ГР имела значения 119,45 (96,30-162,74) нмоль/мин×мг белка, ТРР – 20,31 (16,25-24,37) нмоль/мин×мг белка, а ГПО – 10,54 (8,18-12,20) мкмоль/мин×мг белка, что было достоверно ниже в 2,62 ( $p < 0,05$ ) и выше в 4,57 ( $p < 0,05$ ), в 1,86 раза ( $p < 0,05$ ), соответственно, по сравнению с результатами в интактных лимфоцитах крови; кроме этого, нами было зафиксировано достоверно значимое снижение активности ГР в 2,32 раза ( $p < 0,05$ ) и увеличение активности ТРР – в 2,61 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значений в лимфоцитах крови при моделировании ОС *in vitro*, соответственно (таблица 13).

Полученные нами результаты позволяют сделать заключение об изменении редокс-статуса опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови в условиях моделирования ОС *in vitro* за счет увеличения фракции восстановленного глутатиона. Причиной снижения активности ГР в опухолевых клетках линии Jurkat могло стать повреждающее действие высоких концентраций АФК на молекулы ферментов. Повышение активности ТРР при опухолевой

трансформации необходимо для обеспечения пролиферативной активности опухолевых клеток линии Jurkat.

### **3.7 Состояние тиолдисульфидной системы в опухолевых клетках линии Jurkat при различных условиях культивирования**

Благодаря гиперпродукции АФК, были сформированы изменения в антиоксидантной системе опухолевых клеток, что позволило им успешно функционировать и избегать запрограммированной гибели. В связи с этим выяснение особенностей состояния тиолдисульфидной системы опухолевых клеток линии Jurkat при внесении в среду культивирования индуктора апоптоза и/или редокс-модуляторов, а также ингибитора Hsp27, с последующим сопоставлением полученных данных с показателями реализации и регуляции апоптоза, позволило нам установить роль тиолдисульфидной системы в дизрегуляции запрограммированной клеточной гибели, а также участие Hsp27 в поддержании функционального состояния компонентов тиолдисульфидной системы.

Индукция апоптоза с помощью добавления DEX в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat сопровождалась достоверно значимым снижением величины соотношения GSH/GSSG в 1,51 раза ( $p < 0,05$ ) и активности ГРР в 1,85 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне активации ГР в 4,15 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 13, 14).

С помощью внесения блокатора SH-групп пептидов и белков в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat нами был получен клеточный ответ – достоверно значимое снижение содержания GSH в 4,45 раза ( $p < 0,05$ ) и величины соотношения GSH/GSSG – в 5,05 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения активности ГР в 1,32 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 13, 14).

Таблица 14 – Показатели тиолдисульфидной системы в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и в условиях культивирования с DEX и/или NEM, DTE, BSO, KRIBB3, (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы		Содержание GSH, нмоль/мг белка	Содержание GSSG, нмоль/мг белка	Величина соотношения GSH/GSSG	Активность ГР, нмоль/мин×мг белка	Активность ТРР, нмоль/мин×мг белка	Активность ГПО, мкмоль/мин×мг белка	
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	1	2,051 (1,927-2,314)	0,164 (0,150-0,190)	13,140 (11,361-14,230)	119,45 (96,30-162,74)	20,31 (16,25-24,37)	10,54 (8,18-12,20)	
Опухолевые клетки линии Jurkat, культивированные при добавлении	DEX	2	1,750 (1,010-2,060)	0,201 (0,110-0,261)	8,710 (7,780-9,190) p <sub>2-1</sub> <0,05	496,30 (485,20-502,80) p <sub>2-1</sub> <0,05	10,96 (7,66-13,04) p <sub>2-1</sub> <0,05	9,98 (9,31-11,60)
	NEM	3	0,461 (0,442-0,540) p <sub>3-1</sub> <0,05	0,179 (0,150-0,230)	2,600 (1,960-3,070) p <sub>3-1</sub> <0,05	90,40 (64,20-95,40) p <sub>3-1</sub> <0,05	17,81 (13,23-20,97)	10,46 (9,55-12,64)
	NEM+DEX	4	0,136 (0,133-0,200) p <sub>4-1</sub> <0,05; p <sub>4-2</sub> <0,05 p <sub>4-3</sub> <0,05	0,065 (0,055-0,110) p <sub>4-1</sub> <0,05; p <sub>4-2</sub> <0,05 p <sub>4-3</sub> <0,05	2,080 (1,820-2,490) p <sub>4-1</sub> <0,05; p <sub>4-2</sub> <0,05	43,50 (43,20-65,70) p <sub>4-1</sub> <0,05 p <sub>4-2</sub> <0,05	16,42 (11,79-18,37)	6,69 (5,98-7,40) p <sub>4-1</sub> <0,05; p <sub>4-2</sub> <0,05; p <sub>4-3</sub> <0,05
	DTE	5	0,810 (0,700-1,321) p <sub>5-1</sub> <0,05	0,235 (0,141-0,262)	3,735 (2,910-5,160) p <sub>5-1</sub> <0,05	175,20 (123,40-179,40)	5,55 (4,28-7,87) p <sub>5-1</sub> <0,05	9,21 (8,00-10,20)
	DTE+DEX	6	0,341 (0,191-0,470) p <sub>6-1</sub> <0,05; p <sub>6-2</sub> <0,05 p <sub>6-5</sub> <0,05	0,056 (0,040-0,111) p <sub>6-1</sub> <0,05; p <sub>6-2</sub> <0,05 p <sub>6-5</sub> <0,05	4,800 (3,250-5,460) p <sub>6-1</sub> <0,05; p <sub>6-2</sub> <0,05	156,70 (145,60-199,40) p <sub>6-2</sub> <0,05	15,78 (11,14-28,13) p <sub>6-5</sub> <0,05	13,13 (12,29-15,64) p <sub>6-2</sub> <0,05; p <sub>6-5</sub> <0,05
	BSO	7	0,404 (0,256-0,481) p <sub>7-1</sub> <0,05	0,135 (0,060-0,179)	3,260 (2,470-4,060) p <sub>7-1</sub> <0,05	139,60 (112,40-147,80)	6,82 (6,16-9,33) p <sub>7-1</sub> <0,05	7,19 (6,27-8,97)

Продолжение таблицы 14

Группы		Содержание GSH, нмоль/мг белка	Содержание GSSG, нмоль/мг белка	Величина соотношения GSH/GSSG	Активность ГР, нмоль/мин×мг белка	Активность ТРР, нмоль/мин×мг белка	Активность ГПО, мкмоль/мин×мг белка
Опухолевые клетки линии Jurkat, культивируемые при добавлении	BSO+DEX	8 0,085 (0,044-0,115) p <sub>8-1</sub> <0,05; p <sub>8-2</sub> <0,05 p <sub>8-7</sub> <0,05	0,013 (0,006-0,020) p <sub>8-1</sub> <0,05; p <sub>8-2</sub> <0,05 p <sub>8-7</sub> <0,05	9,630 (4,296-12,702)	90,50 (89,90-92,10) p <sub>8-2</sub> <0,05	4,31 (3,41-5,40) p <sub>8-1</sub> <0,05; p <sub>8-2</sub> <0,05; p <sub>8-7</sub> <0,05	6,49 (6,07-9,76) p <sub>8-1</sub> <0,05; p <sub>8-2</sub> <0,05
	KRIBB3	9 2,542 (1,970-3,640)	0,650 (0,620-0,718) p <sub>9-1</sub> <0,05	4,802 (4,100-5,180) p <sub>9-1</sub> <0,05	422,90 (389,21-435,23) p <sub>9-1</sub> <0,05	6,24 (5,46-7,17) p <sub>9-1</sub> <0,05	12,50 (7,59-13,90)
	KRIBB3+DEX	10 1,356 (0,616-2,992)	0,141 (0,041-0,386) p <sub>10-9</sub> <0,05	8,970 (8,020-14,150) p <sub>10-9</sub> <0,05	537,21 (447,23-658,21) p <sub>10-1</sub> <0,05	10,75 (8,16-12,55) p <sub>10-1</sub> <0,05 p <sub>10-9</sub> <0,05	8,89 (8,15-9,66)

Примечание – p<sub>n-m</sub> – уровень статистической значимости различий между соответствующими группами сравнения, GSH – восстановленный глутатион, GSSG – окисленный глутатион, ГР – глутатионредуктаза, ТРР – тиоредоксинредуктаза, ГПО – глутатионпероксидаза; DEX – дексаметазон, NEM – N-этилмалеимид, DTE – 1,4-дителиозитритол, BSO – бутионин-сульфоксимин, KRIBB3 – 5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол

Добавление DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с NEM, позволило нам установить достоверно значимое снижение содержания GSH в 15,08 раза ( $p < 0,05$ ) и в 12,87 раза ( $p < 0,05$ ), GSSG – в 2,52 раза ( $p < 0,05$ ) и в 3,09 раза ( $p < 0,05$ ), величины соотношения GSH/GSSG – в 6,32 раза ( $p < 0,05$ ) и в 4,19 раза ( $p < 0,05$ ), соответственно, по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках и опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 13, 14). Снижение содержания восстановленной формы тиола в опухолевых клетках линии Jurkat при внесении в среду культивирования DEX и NEM привело к закономерному снижению активности ГПО – фермента, использующего GSH в качестве одного из субстратов реакции. Так, при добавлении DEX и NEM в среду инкубирования опухолевых клеток линии Jurkat нами было получено достоверно значимое снижение активности ГПО в 1,58 раза ( $p < 0,05$ ) и в 1,49 раза ( $p < 0,05$ ), а также ГР – в 2,75 раза ( $p < 0,05$ ) и в 11,41 раза ( $p < 0,05$ ), соответственно, по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках и опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 13, 14). Кроме этого, в опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных в присутствии DEX и NEM, нами было установлено достоверно значимое снижение содержания GSH в 3,39 раза ( $p < 0,05$ ) и GSSG – в 2,75 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения активности ГПО в 1,56 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами, полученными при оценке в опухолевых клетках, культивированных при добавлении только NEM (таблица 14).

Несмотря на внесение в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat протектора SH-групп пептидов и белков, нами было получено достоверно значимое снижение содержания восстановленной формы тиола в 2,53 раза ( $p < 0,05$ ) и величины соотношения GSH/GSSG – в 3,52 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения активности ГРР в 3,66 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 13, 14). Внесение DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с DTE, сопровождалось достоверно значимым снижением содержания GSH в 6,01 раза ( $p < 0,05$ ) и 5,13 раза ( $p < 0,05$ ),

GSSG – в 2,93 раза ( $p < 0,05$ ) и в 3,59 раза ( $p < 0,05$ ), величины соотношения GSH/GSSG – в 2,74 раза ( $p < 0,05$ ) и в 1,81 раза ( $p < 0,05$ ), соответственно, по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках и опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 13, 14). Низкое содержание восстановленного тиола в условиях внесения DEX и DTE в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat было обусловлено достоверно значимым снижением активности фермента, восстанавливающего окисленную форму глутатиона – ГР в 3,17 раза ( $p < 0,05$ ) и повышением активности фермента, использующего GSH в качестве субстрата – ГПО в 1,32 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значений в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблица 14). Также, в опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных в присутствии DEX и DTE, было установлено достоверно значимое снижение содержания GSH в 2,38 раза ( $p < 0,05$ ), GSSG – в 4,20 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне повышения активности ГПО в 1,43 раза ( $p < 0,05$ ) и TRP – в 2,84 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в опухолевых клетках, культивированных при добавлении только DTE (таблица 14).

При ингибировании синтеза глутатиона *de novo* в опухолевых клетках линии Jurkat с помощью внесения в среду культивирования BSO нами было получено достоверно значимое снижение содержания GSH в 5,08 раза ( $p < 0,05$ ) и величины соотношения GSH/GSSG – в 4,03 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения активности TRP в 2,98 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 13, 14). Внесение DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с BSO, сопровождалось достоверно значимым снижением содержания GSH в 24,13 раза ( $p < 0,05$ ) и GSSG – в 12,62 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения активности ГПО – в 1,62 раза ( $p < 0,05$ ) и TRP – в 4,71 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках; кроме этого, нами было отмечено достоверно значимое снижение концентрации GSH в 20,59 раза ( $p < 0,05$ ), GSSG – в 15,46 раза ( $p < 0,05$ ), активности ГПО – в 1,54 раза ( $p < 0,05$ ) и TRP – в 2,54 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в

опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 13, 14). Низкое содержание GSH в условиях внесения ингибитора  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазы – BSO и индуктора апоптоза – DEX в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat было обусловлено достоверно значимым снижением активности ГР в 5,48 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значения в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблица 14). Также, в опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных при добавлении DEX и BSO, нами было установлено достоверно значимое снижение содержания GSH в 4,75 раза ( $p < 0,05$ ), GSSG – в 10,38 раза ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения активности ТРР в 1,58 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только BSO (таблица 14).

Оценка участия Hsp27 в функционировании компонентов тиолдисульфидной системы опухолевых клеток линии Jurkat была проведена с помощью внесения в среду культивирования KRIBB3. При этом нами было получено достоверно значимое увеличение содержания GSSG в 3,96 раза ( $p < 0,05$ ) и активности ГР – в 3,54 раза ( $p < 0,05$ ), снижение величины соотношения GSH/GSSG – в 2,74 раза ( $p < 0,05$ ) и активности ТРР – в 3,25 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 13, 14). Добавление DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с KRIBB3, сопровождалось достоверно значимым увеличением активности ГР в 4,50 раза ( $p < 0,05$ ) и снижением активности ТРР в 1,89 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значений в интактных опухолевых клетках (таблицы 13, 14). Также, в опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных в присутствии DEX и KRIBB3, было установлено достоверно значимое снижение содержания GSSG в 4,61 раза ( $p < 0,05$ ) и увеличение величины соотношения GSH/GSSG в 1,87 раза ( $p < 0,05$ ), активности ТРР – в 1,72 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в опухолевых клетках, культивированных при добавлении только KRIBB3 (таблица 14).

Влияние NEM и BSO на опухолевые клетки линии Jurkat привело к ожидаемому эффекту со стороны компонентов тиолдисульфидной системы.

Однако, в случае действия DTE, нами было получено снижение концентрации GSH.

Наряду с этим, ингибирование Hsp27 сопровождалось максимальным увеличением концентрации окисленной формы глутатиона. Вероятнее всего, снижение активности Hsp27 препятствовало взаимодействию белков клетки с GSSG, что косвенно доказывает участие этого шаперона в глутатионилировании протеинов.

### **3.8 Оценка окислительной модификации белков в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови**

Модификация протеинов АФК и токсическими альдегидами (4-гидрокси-2-алкенали, 4,5-эпокси-2-алкенали) занимает ведущее место при развитии ОС и снижении активности антиоксидантной системы в клетке [436]. Белковые молекулы представляют собой потенциальные мишени для атаки АФК, а их окислительная модификация рассматривается как один из ранних маркеров ОС [17, 356].

В лимфоцитах крови и опухолевых клетках линии Jurkat была проведена сравнительная оценка содержания продуктов необратимой ОМБ – КПБ, битирозина, окисленного триптофана, а также определен уровень белково-связанного глутатиона – как показателя обратимой окислительной модификации протеинов.

При изучении ОМБ в интактных лимфоцитах крови нами было установлено содержание SH-групп белков 2,84 (1,79-2,94) нмоль/мг белка, белково-связанного глутатиона – 0,05 (0,04-0,06) нмоль/мг белка, КПБ – 0,149 (0,142-0,151) нмоль/мг белка, окисленного триптофана – 2,31 (2,16-2,34) у.е./мг белка, а битирозина – 0,13 (0,12-0,20) у.е./мг белка (таблица 15).

При моделировании ОС *in vitro* в лимфоцитах крови содержание SH-групп белков составило 0,33 (0,28-0,38) нмоль/мг белка, белково-связанного глутатиона – 0,14 (0,13-0,15) нмоль/мг белка, КПБ – 0,359 (0,354-0,362) нмоль/мг белка, что

было достоверно ниже в 8,61 раза ( $p < 0,05$ ) и выше в 2,80 раза ( $p < 0,05$ ) и в 2,41 раза ( $p < 0,05$ ), соответственно, по сравнению с показателями в интактных лимфоцитах крови (таблица 15).

Таблица 15 – Параметры окислительной модификации белков в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, интактных лимфоцитах крови и в условиях окислительного стресса *in vitro*, (Me ( $Q_1$ - $Q_3$ ))

Группы		Содержание белок-SH, нмоль/мг белка	Содержание белок-SSG, нмоль/мг белка	Содержание КПБ, нмоль/мг белка	Содержание окисленного триптофана, у.е./мг белка	Содержание битирозина, у.е./мг белка
Интактные лимфоциты крови	1	2,84 (1,79-2,94)	0,05 (0,04-0,06)	0,149 (0,142-0,151)	2,31 (2,16-2,34)	0,13 (0,12-0,20)
Лимфоциты крови +0,5 мМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	0,33 (0,28-0,38) $p_{2-1} < 0,05$	0,14 (0,13-0,15) $p_{2-1} < 0,05$	0,359 (0,354-0,362) $p_{2-1} < 0,05$	–	–
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	3	1,26 (1,08-1,34) $p_{3-1} < 0,05$ $p_{3-2} < 0,05$	0,42 (0,40-0,57) $p_{3-1} < 0,05$ $p_{3-2} < 0,05$	0,382 (0,379-0,388) $p_{3-1} < 0,05$	25,19 (22,14-38,30) $p_{3-1} < 0,05$	0,76 (0,51-1,52) $p_{3-1} < 0,05$

Примечание –  $p_{n-m}$  – уровень статистической значимости различий между соответствующими группами сравнения, белок-SH – SH-группы белков, белок-SSG – белково-связанный глутатион, КПБ – карбонильные производные белков

В интактных опухолевых клетках линии Jurkat содержание SH-групп протеинов составило 1,26 (1,08-1,34) нмоль/мг белка, белково-связанного глутатиона – 0,42 (0,40-0,57) нмоль/мг белка, КПБ – 0,382 (0,379-0,388) нмоль/мг белка, окисленного триптофана – 25,19 (22,14-38,30) у.е./мг белка, битирозина – 0,76 (0,51-1,52) у.е./мг белка. В опухолевых клетках линии Jurkat нами было зафиксировано достоверное значимое снижение концентрации SH-групп белков в 2,25 раза ( $p < 0,05$ ) и увеличение белково-связанного глутатиона в 8,40 раза ( $p < 0,05$ ), КПБ – в 2,56 раза ( $p < 0,05$ ), окисленного триптофана – в 10,90 раза

( $p < 0,05$ ), битирозина – в 5,85 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в интактных лимфоцитах крови; кроме этого, нами было установлено достоверно значимое увеличение содержания SH-групп протеинов в 3,82 раза ( $p < 0,05$ ) и белково-связанного глутатиона – в 3,00 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значений в лимфоцитах крови при моделировании ОС *in vitro* (таблица 15).

Образование окисленного триптофана и битирозиновых сшивок в молекулах белков происходит, благодаря взаимодействию гидроксильного радикала с кольцами триптофана и тирозина [313]. Наличие битирозиновых сшивок обеспечивает механическую стабильность биологических структур, так как придает гидрофобность белковым молекулам. Токсический эффект белковых радикальных центров проявляется в белково-опосредованной инициации перекисного окисления липидов, в транслокации радикальных центров от одного аминокислотного остатка к другому через внутри- и межмолекулярные механизмы [17].

Причиной повышения уровня КПБ в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови при ОС *in vitro* являлась не только посттрансляционная окислительная модификация протеинов за счет высокого уровня АФК, но и, возможно, снижение скорости их протеолитической деградации в связи с повреждением или нарушением конформации ферментов протеолиза.

### **3.9 Оценка окислительной модификации белков в опухолевых клетках линии Jurkat при различных условиях культивирования**

В данном разделе представлены результаты изменения уровня окислительно-модифицированных аминокислот и белков в опухолевых клетках линии Jurkat при внесении в среду культивирования индуктора апоптоза и/или редокс-модуляторов, а также ингибитора Hsp27. Дальнейшее сопоставление полученных результатов с показателями реализации и регуляции апоптоза нам

позволило установить роль ОМБ в дизрегуляции программированной гибели клеток.

При индуцировании апоптоза с помощью добавления DEX в среду культивирования, опухолевые клетки линии Jurkat характеризовались достоверно значимым снижением содержания SH-групп белков в 2,86 раза ( $p < 0,05$ ) и белково-связанного глутатиона – в 2,33 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 15, 16).

Блокирование SH-групп пептидов и белков, путем внесения в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat NEM, сопровождалось наличием клеточного ответа в виде достоверно значимого снижения содержания SH-групп протеинов в 3,00 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателем в интактных опухолевых клетках (таблицы 15, 16). Одновременное добавление DEX и NEM в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat позволило нам установить достоверно значимое снижение содержания не только SH-групп белков в 5,73 раза ( $p < 0,05$ ), но и белково-связанного глутатиона – в 2,10 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках; кроме этого, концентрация SH-групп протеинов была достоверно ниже в 2,00 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 15, 16).

Добавление протектора SH-групп пептидов и белков в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым увеличением содержания SH-групп протеинов в 1,33 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателем в интактных опухолевых клетках (таблицы 15, 16). Внесение DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с DTE, сопровождалось достоверно значимым снижением содержания SH-групп белков в 2,42 раза ( $p < 0,05$ ) и белково-связанного глутатиона – в 1,50 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значений в интактных опухолевых клетках (таблицы 15, 16).

Таблица 16 – Параметры окислительной модификации белков в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и в условиях культивирования с DEX и/или NEM, DTE, BSO, KRIBB3, (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы		Содержание белок-SH, нмоль/мг белка	Содержание белок-SSG, нмоль/мг белка	Содержание КПБ, нмоль/мг белка	Содержание окисленного триптофана, у.е./мг белка	Содержание битирозина, у.е./мг белка
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	1	1,26 (1,08-1,34)	0,42 (0,40-0,57)	0,382 (0,379-0,388)	25,19 (22,14-38,30)	0,76 (0,51-1,52)
Опухолевые клетки линии Jurkat, культивированные при добавлении	DEX	2 0,44 (0,41-0,56) p <sub>2-1</sub> <0,05	0,18 (0,13-0,26) p <sub>2-1</sub> <0,05	0,539 (0,515-0,558) p <sub>2-1</sub> <0,05	24,92 (19,74-30,72)	0,60 (0,49-0,79)
	NEM	3 0,42 (0,26-0,48) p <sub>3-1</sub> <0,05	0,24 (0,20-0,47)	0,514 (0,509-0,519) p <sub>3-1</sub> <0,05	13,82 (11,18-26,61)	0,87 (0,86-1,89)
	NEM+DEX	4 0,22 (0,15-0,28) p <sub>4-1</sub> <0,05; p <sub>4-2</sub> <0,05	0,20 (0,16-0,22) p <sub>4-1</sub> <0,05	0,569 (0,560-0,571) p <sub>4-1</sub> <0,05; p <sub>4-3</sub> <0,05	13,99 (11,56-14,38) p <sub>4-1</sub> <0,05; p <sub>4-2</sub> <0,05	1,09 (1,06-1,19) p <sub>4-2</sub> <0,05
	DTE	5 1,67 (1,46-1,87) p <sub>5-1</sub> <0,05	0,63 (0,19-0,77)	0,350 (0,322-0,365) p <sub>5-1</sub> <0,05	11,91 (10,62-12,44) p <sub>5-1</sub> <0,05	0,17 (0,16-0,19) p <sub>5-1</sub> <0,05
	DTE+DEX	6 0,52 (0,36-0,78) p <sub>6-1</sub> <0,05; p <sub>6-5</sub> <0,05	0,28 (0,18-0,33) p <sub>6-1</sub> <0,05	0,375 (0,344-0,394) p <sub>6-2</sub> <0,05	13,97 (11,37-17,01) p <sub>6-1</sub> <0,05; p <sub>6-2</sub> <0,05	0,17 (0,12-0,19) p <sub>6-1</sub> <0,05; p <sub>6-2</sub> <0,05
	BSO	7 0,42 (0,35-0,46) p <sub>7-1</sub> <0,05	0,06 (0,04-0,07) p <sub>7-1</sub> <0,05	0,555 (0,548-0,566) p <sub>7-1</sub> <0,05	14,22 (10,36-16,62) p <sub>7-1</sub> <0,05	0,78 (0,53-1,46)
	BSO+DEX	8 0,36 (0,33-0,39) p <sub>8-1</sub> <0,05; p <sub>8-2</sub> <0,05	0,03 (0,02-0,03) p <sub>8-1</sub> <0,05; p <sub>8-2</sub> <0,05 p <sub>8-7</sub> <0,05	0,586 (0,579-0,590) p <sub>8-1</sub> <0,05	10,79 (8,62-11,51) p <sub>8-1</sub> <0,05; p <sub>8-2</sub> <0,05	0,79 (0,73-0,84)
	KRIBB3	9 0,35 (0,29-0,57) p <sub>9-1</sub> <0,05	0,16 (0,15-0,18) p <sub>9-1</sub> <0,05	0,664 (0,601-0,702) p <sub>9-1</sub> <0,05	17,44 (16,81-19,29) p <sub>9-1</sub> <0,05	0,65 (0,49-0,68)
	KRIBB3+DEX	10 0,18 (0,17-0,19) p <sub>10-1</sub> <0,05; p <sub>10-2</sub> <0,05 p <sub>10-9</sub> <0,05	0,29 (0,12-0,35) p <sub>10-1</sub> <0,05	0,792 (0,776-0,821) p <sub>10-1</sub> <0,05; p <sub>10-2</sub> <0,05 p <sub>10-9</sub> <0,05	23,19 (20,92-25,21) p <sub>10-9</sub> <0,05	1,41 (1,11-1,46) p <sub>10-2</sub> <0,05 p <sub>10-9</sub> <0,05

Примечание – p<sub>n-m</sub> – уровень статистической значимости различий между соответствующими группами сравнения, белок-SH – SH-группы белков, белок-SSG – белково-связанный глутатион, КПБ – карбонильные производные белков, DEX – дексаметазон, NEM – N-этилмалеимид, DTE – 1,4-дитиоэритритол, BSO – бутионин-сульфоксмин, KRIBB3 – 5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол

Помимо этого, в опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных в присутствии DEX и DTE, нами было получено достоверно значимое снижение содержания SH-групп протеинов в 3,21 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателем в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DTE (таблица 16).

Действие ингибитора синтеза глутатиона *de novo* в опухолевых клетках линии Jurkat характеризовалось достоверно значимым снижением содержания SH-групп белков в 3,00 раза ( $p < 0,05$ ) и белково-связанного глутатиона – в 7,00 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 15, 16). Одновременное добавление DEX и BSO в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым снижением содержания как SH-групп протеинов в 3,50 раза ( $p < 0,05$ ) и в 1,22 раза ( $p < 0,05$ ), так и белково-связанного глутатиона – в 14,00 раза ( $p < 0,05$ ) и в 6,00 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значений в интактных опухолевых клетках и опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX, соответственно (таблицы 15, 16). Также, в опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных в присутствии DEX и BSO, нами было установлено достоверно значимое снижение содержания белково-связанного глутатиона в 2,00 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатом, полученном при оценке опухолевых клеток, культивированных при добавлении только BSO (таблица 16).

В проведенном нами исследовании было установлено, что Hsp27 участвовал в поддержании состояния восстановленности SH-групп белков и в обратимой окислительной модификации протеинов – глутатионилировании. Так, в опухолевых клетках линии Jurkat в условиях добавления в среду культивирования KRIBB3 нами было получено достоверно значимое снижение содержания SH-групп белков в 3,60 раза ( $p < 0,05$ ) и белково-связанного глутатиона – в 2,63 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 15, 16). Активацией окислительной модификации белков сопровождалось одновременное внесение DEX и KRIBB3 в

культуральную среду опухолевых клеток, что выражалось в достоверно значимом снижении содержания SH-групп белков в 7,00 раза ( $p < 0,05$ ) и белково-связанного глутатиона – в 1,45 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках; кроме этого, содержание SH-групп протеинов было ниже в 2,44 раза ( $p < 0,05$ ), чем в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 15, 16). Добавление в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat индуктора апоптоза, наряду с ингибитором Hsp27, сопровождалось достоверно значимым снижением содержания SH-групп протеинов в 1,94 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только KRIBB3 (таблица 16).

Действие DEX в опухолевых клетках линии Jurkat достоверно значимо увеличивало содержание КПБ в 1,41 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактной культурой опухолевых клеток (таблицы 15, 16).

В опухолевых клетках линии Jurkat блокирование SH-групп пептидов и белков приводило к достоверно значимому увеличению содержания КПБ в 1,35 раза ( $p < 0,05$ ) относительно показателя в интактных опухолевых клетках (таблицы 15, 16). Внесение DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с NEM, сопровождалось достоверно значимым увеличением содержания КПБ в 1,49 раза ( $p < 0,05$ ) и снижением содержания окисленного триптофана в 1,80 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках; кроме этого, следует отметить, что достоверно низким было содержание окисленного триптофана (в 1,78 раза ( $p < 0,05$ )) и битирозина (в 1,82 раза ( $p < 0,05$ )) относительно результатов, полученных в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 15, 16). Также, одновременное добавление DEX и NEM в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat характеризовалось достоверно значимым увеличением содержания КПБ в 1,11 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателем в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только NEM (таблица 16).

Действие протектора SH-групп пептидов и белков в опухолевых клетках линии Jurkat достоверно значимо снижало содержание КПБ в 1,09 раза ( $p < 0,05$ ), окисленного триптофана – в 2,12 раза ( $p < 0,05$ ), битирозина – в 4,47 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значений в интактной культуре опухолевых клеток (таблицы 15, 16). Одновременное добавление DEX и DTE в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым снижением содержания окисленного триптофана в 1,80 раза ( $p < 0,05$ ) и битирозина – в 4,47 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значений в интактных опухолевых клетках; кроме этого, нами было установлено достоверно значимое снижение концентрации КПБ в 1,44 раза ( $p < 0,05$ ), окисленного триптофана – в 1,78 раза ( $p < 0,05$ ), битирозина – в 3,53 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблица 16). Вероятнее всего, в этом случае, защитное действие на состояние белковых молекул оказывал DTE.

При ингибировании синтеза глутатиона *de novo* в опухолевых клетках линии Jurkat с помощью добавления в среду культивирования BSO было получено достоверно значимое увеличение содержания КПБ в 1,45 раза ( $p < 0,05$ ) и снижение концентрации окисленного триптофана в 1,77 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 15, 16). Более значительное увеличение содержания КПБ (в 1,53 раза ( $p < 0,05$ )) и снижение концентрации окисленного триптофана (в 2,33 раза ( $p < 0,05$ )), по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках, вызывало одновременное добавление BSO и DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat; кроме этого, содержание окисленного триптофана было достоверно ниже в 2,31 раза ( $p < 0,05$ ), чем в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 15, 16).

Ингибирование Hsp27 в опухолевых клетках линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым увеличением содержания КПБ в 1,74 раза ( $p < 0,05$ ) и снижением концентрации окисленного триптофана в 1,44 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 15, 16).

Добавление DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с KRIBB3, сопровождалось достоверно значимым увеличением содержания КПБ в 2,07 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значения в интактной культуре опухолевых клеток; кроме этого, содержание КПБ было достоверно выше в 1,47 раза ( $p < 0,05$ ), а битирозина – в 2,35 раза ( $p < 0,05$ ), чем в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 15, 16). Также, в опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных при добавлении DEX и KRIBB3, было установлено достоверно значимое увеличение содержания КПБ в 1,19 раза ( $p < 0,05$ ), окисленного триптофана – в 1,33 раза ( $p < 0,05$ ) и битирозина – в 2,17 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только KRIBB3 (таблица 16).

Накопление необратимо модифицированных протеинов оказывало цитотоксичный эффект на опухолевые клетки линии Jurkat, так как при действии блокаторов SH-групп пептидов и белков, а также ингибитора Hsp27 или синтеза глутатиона *de novo* повышался процент апоптотически измененных клеток (таблицы 5, 8, 15, 16).

Карбонильные производные белков и битирозиновые сшивки протеинов в последнее время рассматриваются в качестве маркеров окисления белков *in vivo*, так как в норме в полипептидах отсутствуют. Ввиду того, что они практически не подвергаются рефолдингу, для клетки жизненно-необходимым процессом является их своевременная деградация.

### **3.10 Оценка убиквитин-зависимой деградации белков в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови**

Окислительная модификация протеинов способствует активации их рефолдинга или деградации. Деградация поврежденных белковых молекул должна быть высокоселективной и осуществляться в изолированных компартментах клетки. Однако, следует отметить, что лизосомальный протеолиз

является неспецифичным процессом. Деградация подавляющего большинства (до 90%) внутриклеточных поврежденных белков осуществляется с помощью протеасом [55, 62].

Протеасомы представляют собой ферментативный комплекс, отвечающий за специфичный протеолиз белков-мишеней, обладают трипсиноподобной, химотрипсиноподобной, каспазной активностями. Детекция субстрата для деградации осуществляется путем наличия метки – полиубиквитина, присоединение которой обеспечивается лигазной реакцией [55, 143, 464, 508].

В интактных лимфоцитах крови с помощью ПЦР в режиме реального времени нами был определен уровень экспрессии мРНК гена убиквитина равный 0,0009 (0,0005-0,0119) у.е., а методом вестерн-блоттинга – содержание убиквитина, которое составило 0,031 (0,025-0,033) у.е. (таблица 17).

Таблица 17 – Содержание убиквитина и убиквитинлигазы в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови, (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы		Уровень экспрессии мРНК гена убиквитина, у.е.	Содержание убиквитина, у.е.	Содержание убиквитинлигазы, у.е.
Интактные лимфоциты крови	1	0,0009 (0,0005-0,0119)	0,138 (0,117-0,144)	–
Интактные опухолевые клетки линии Jurkat	2	0,0165 (0,0045-0,0177) p <sub>2-1</sub> <0,05	3,177 (3,099-3,412) p <sub>2-1</sub> <0,05	1,672 (1,588-1,711)

В интактных опухолевых клетках линии Jurkat был установлен уровень экспрессии мРНК гена убиквитина, равный 0,0165 (0,0045-0,0177) у.е., а также выявлена концентрация убиквитина 3,177 (3,099-3,412) у.е., что было достоверно выше в 18,33 раза (p<0,05) и в 23,02 раза (p<0,05), соответственно, по сравнению с показателем в интактных лимфоцитах крови, а убиквитинлигазы – 1,672 (1,588-1,711) у.е. (таблица 17, рисунок 20).

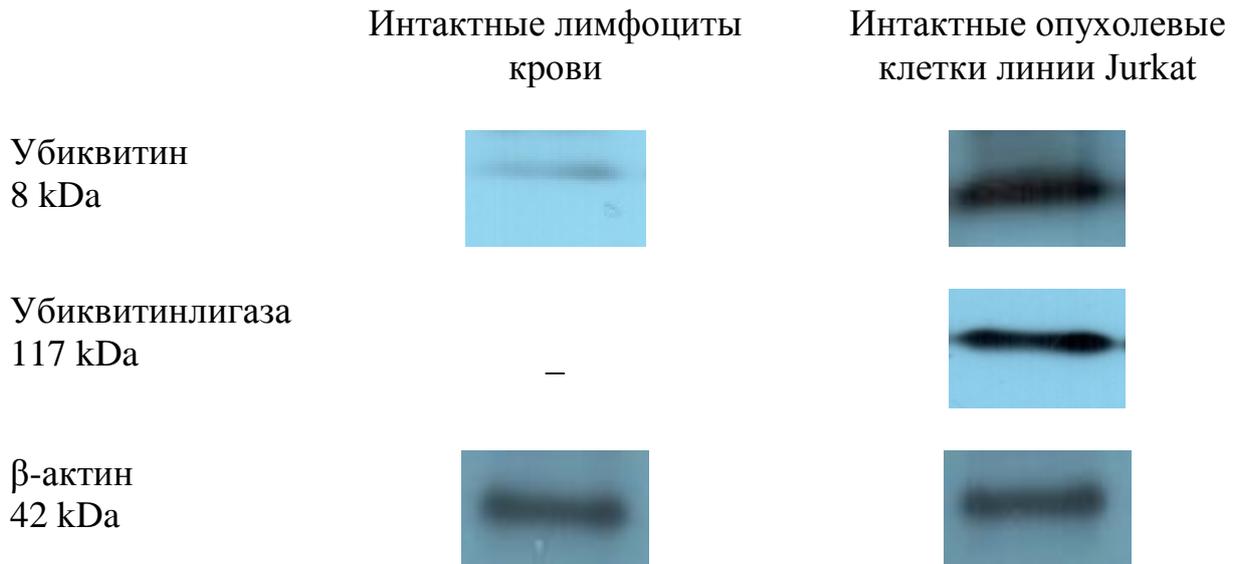


Рисунок 20 – Содержание убиквитина, убиквитинлигазы и  $\beta$ -актина в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови, определенное с помощью вестерн-блотт анализа

Увеличение содержания убиквитина при опухолевой прогрессии можно рассматривать как компенсаторно-приспособительную реакцию, позволяющую максимально быстро удалять окислительно-модифицированные белковые молекулы по убиквитин-зависимому пути, так как высокий уровень необратимой ОМБ может быть причиной запуска апоптоза.

### **3.11 Оценка убиквитин-зависимой деградации белков в опухолевых клетках линии Jurkat при различных условиях культивирования**

Важнейшим механизмом поддержания внутриклеточного гомеостаза является селективный протеолиз. При ряде патологических процессов, в том числе и опухолевой прогрессии, сопровождающейся прооксидантным сдвигом и накоплением нерепарируемых ОМБ, наблюдается «ускользание» клеток от апоптоза. В связи с этим представилось интересным оценить уровень убиквитина и убиквитинлигазы в опухолевых клетках линии Jurkat при внесении в среду

культивирования индуктора апоптоза и/или редокс-модуляторов, а также ингибитора Hsp27 с помощью вестерн-блотт-анализа.

Так, в опухолевых клетках линии Jurkat действие индуктора апоптоза сопровождалось достоверно значимым снижением содержания убиквитина в 1,96 раза ( $p < 0,05$ ) и увеличением – убиквитинлигазы в 1,31 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 17, 18).

Таблица 18 – Содержание убиквитина и убиквитинлигазы в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и в условиях культивирования с DEX и/или NEM, DTE, BSO, KRIBB3, (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы			Содержание убиквитина, у.е.	Содержание убиквитинлигазы, у.е.
Интактные клетки линии Jurkat	опухолевые клетки линии Jurkat	1	3,177 (3,099-3,412)	1,672 (1,588-1,711)
Опухолевые клетки линии Jurkat, культивируемые при добавлении	DEX	2	1,620 (1,608-1,631) $p_{2-1} < 0,05$	2,190 (2,118-2,304) $p_{2-1} < 0,05$
	NEM	3	2,417 (2,311-2,521) $p_{3-1} < 0,05$	3,558 (3,112-3,617) $p_{3-1} < 0,05$
	NEM+DEX	4	0,945 (0,885-1,020) $p_{4-1} < 0,05$ ; $p_{4-2} < 0,05$	1,332 (1,115-1,559) $p_{4-1} < 0,05$ ; $p_{4-2} < 0,05$ $p_{4-3} < 0,05$
	DTE	5	1,679 (1,665-1,700) $p_{5-1} < 0,05$	0,199 (0,177-0,200) $p_{5-1} < 0,05$
	DTE+DEX	6	1,696 (1,614-1,781) $p_{6-1} < 0,05$	0,159 (0,118-0,200) $p_{6-1} < 0,05$ ; $p_{6-2} < 0,05$
	BSO	7	1,685 (1,612-1,712) $p_{7-1} < 0,05$	0,803 (0,569-0,997) $p_{7-1} < 0,05$
	BSO+DEX	8	2,412 (2,300-2,751) $p_{8-1} < 0,05$ ; $p_{8-2} < 0,05$ $p_{8-7} < 0,05$	1,607 (1,500-1,669) $p_{8-2} < 0,05$ ; $p_{8-7} < 0,05$
	KRIBB3	9	1,211 (1,177-1,272) $p_{9-1} < 0,05$	3,021 (2,881-3,090) $p_{9-1} < 0,05$
	KRIBB3+DEX	10	2,395 (2,223-2,500) $p_{10-1} < 0,05$ ; $p_{10-2} < 0,05$ $p_{10-9} < 0,05$	1,685 (1,512-2,020) $p_{10-2} < 0,05$ ; $p_{10-9} < 0,05$

Блокирование SH-групп пептидов и белков в опухолевых клетках линии Jurkat характеризовалось достоверно значимым снижением содержания убиквитина в 1,31 раза ( $p < 0,05$ ) и увеличением – убиквитинлигазы в 2,13 раза

( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в интактной опухолевой культуре (таблицы 17, 18). Внесение DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с NEM, нам позволило установить достоверно значимое снижение содержания убиквитина в 3,36 раза ( $p < 0,05$ ) и в 1,71 раза ( $p < 0,05$ ), убиквитинлигазы в 1,26 раза ( $p < 0,05$ ) и в 1,64 раза ( $p < 0,05$ ), соответственно, по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках и опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 17, 18). В опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных при добавлении DEX и NEM, было установлено достоверно значимое снижение содержания убиквитинлигазы в 2,67 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателем в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только NEM (таблица 18).

Добавление DTE в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым снижением содержания убиквитина в 1,89 раза ( $p < 0,05$ ) и убиквитинлигазы – в 8,40 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 17, 18). Аналогичный эффект был получен при одновременном внесении DEX и DTE в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, так снижение содержания убиквитина было в 1,87 раза ( $p < 0,05$ ), а убиквитинлигазы – в 10,52 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках; также, нами было отмечено достоверно значимое снижение концентрации убиквитинлигазы в 13,77 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значения в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблица 18).

При ингибировании синтеза глутатиона *de novo* в опухолевых клетках линии Jurkat с помощью добавления в среду культивирования BSO нами было получено достоверно значимое снижение содержания убиквитина в 1,89 раза ( $p < 0,05$ ) и убиквитинлигазы – в 2,08 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 17, 18). Внесение DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с BSO, сопровождалось достоверно

значимым снижением содержания только убиквитина в 1,32 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значения в интактных опухолевых клетках; кроме этого, нами было отмечено достоверно значимое увеличение концентрации убиквитина в 1,49 раза ( $p < 0,05$ ) и снижение содержания убиквитинлигазы в 1,36 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 17, 18). При одновременном добавлении DEX и BSO в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat было зафиксировано достоверно значимое увеличение концентрации убиквитина в 1,43 раза ( $p < 0,05$ ) и убиквитинлигазы – в 2,00 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только BSO (таблица 18).

Добавление в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat ингибитора Hsp27 вызвало достоверно значимое снижение содержания убиквитина в 2,62 раза ( $p < 0,05$ ) и увеличение – убиквитинлигазы в 1,81 раза ( $p < 0,05$ ) относительно показателей в интактной культуре опухолевых клеток (таблицы 17, 18). Внесение DEX в культуральную среду опухолевых клеток линии Jurkat, наряду с KRIBB3, сопровождалось достоверно значимым снижением содержания убиквитина в 1,33 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках; кроме этого, нами было отмечено достоверно значимое увеличение концентрации убиквитина в 1,48 раза ( $p < 0,05$ ) и снижение содержания убиквитинлигазы в 1,30 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значений в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только DEX (таблицы 17, 18). В опухолевых клетках линии Jurkat, культивированных при одновременном добавлении DEX и KRIBB3, нами было получено достоверно значимое увеличение содержания убиквитина в 1,98 раза ( $p < 0,05$ ) и снижение концентрации убиквитинлигазы в 1,79 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в опухолевых клетках, культивированных в присутствии только KRIBB3 (таблица 18).

Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что тиолдисульфидная система является важным фактором в поддержании редокс-статуса клетки в физиологических условиях и при опухолевой прогрессии. Следует отметить неоднозначную роль в регуляции апоптоза повышения содержания АФК и уровня ОМБ в лимфоцитах крови и в опухолевых клетках линии Jurkat. Таким образом, полученные нами данные о реализации суицидальной программы, состоянии тиолдисульфидной системы, ОМБ и их деградации в опухолевых клетках линии Jurkat и лимфоцитах крови позволили предположить наличие молекулярных особенностей регуляции апоптоза.

## Глава 4. Обсуждение результатов

### 4.1 Участие активных форм кислорода в регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови в условиях окислительного стресса *in vitro*

В настоящее время идентификация молекулярных механизмов и мишеней регуляции апоптоза является важным направлением фундаментальных исследований. Актуальным аспектом теоретических и экспериментальных работ является эндогенная и экзогенная регуляция запрограммированной гибели клеток. Запуск и реализация апоптоза зависят от наличия и активности модулирующих внутриклеточных факторов и процессов [32, 172, 250]. Нарушения баланса между пролиферацией, дифференцировкой и апоптозом приводят к развитию патологических процессов в различных органах и тканях [108, 197, 336].

Одной из стадий опухолевого роста является опухолевая прогрессия. Опухолевая прогрессия сопровождается изменением метаболизма и функций клеток, образования и утилизации активных кислородных метаболитов; характеризуется формированием ОС, с одной стороны, и ингибированием апоптоза, – с другой стороны. Н.М. Эмануэль (1982) выдвинул гипотезу, согласно которой свободные радикалы играют ключевую роль в процессах злокачественной трансформации клеток [65]. Предполагается, что АФК вызывают генетические мутации и являются инициаторами нарушения дифференцировки клеток, одновременно играя большую роль на всех этапах канцерогенеза [44]. Кроме этого, опухолевой прогрессии способствует иммуносупрессорная активность регуляторных Т-лимфоцитов [286, 322].

В последнее время внимание исследователей направлено на изучение свойств клеточных компонентов иммунной системы, которые осуществляют контроль за генетическим постоянством внутренней среды организма [173, 334, 358, 446]. Различные факторы как экзогенные, так и эндогенные, могут приводить

к модификации состояния компонентов иммунной системы, в том числе лимфоцитов крови, а, следовательно, к изменению их функциональной активности [104, 239, 338, 456]. Лимфоциты крови занимают одну из самых активных позиций в гуморально-клеточном сообществе. Это делает их уникальной мишенью для действия физико-химических факторов, а также удобным объектом в экспериментальных работах по изучению свободно-радикальных процессов. Помимо этого, сведения о воздействии АФК на внутриклеточные структуры и функциональное состояние лимфоцитов крови весьма разрозненны. В связи с этим, актуальным является изучение модулирующего действия АФК на метаболические процессы в лимфоцитах крови человека и дальнейшее сопоставление полученных данных с результатами в опухолевых клетках. Кроме того, доказанное участие АФК в формировании злокачественной трансформации остро ставит проблему поиска молекулярных мишеней для активации апоптотической гибели малигнизированных клеток.

В проведенном нами исследовании была использована модель ОС *in vitro* в лимфоцитах крови. Так, при моделировании ОС в лимфоцитах крови с помощью внесения в среду инкубации пероксида водорода в конечной концентрации 0,5 мМ нами были получены внутриклеточные изменения ключевых параметров, характеризующих редокс-статус лимфоцитов крови, сопоставимые с показателями в опухолевых клетках линии Jurkat. Но, при равных значениях содержания АФК, GSH, GSSG и величины соотношения GSH/GSSG, выживаемость опухолевых клеток линии Jurkat была значительно выше, чем лимфоцитов крови при моделировании ОС *in vitro* (таблица 4). Таким образом, эта модель воспроизводила уровень генерации АФК и изменение содержания компонентов системы глутатиона, характеризующих редокс-статус лимфоцитов крови, сопоставимый с таковым ОС в интактных опухолевых клетках линии Jurkat, но опухолевые клетки отличались активным ингибированием апоптоза, по сравнению с лимфоцитами крови в условиях ОС *in vitro*. Известно,

что в поддержании редокс-баланса клеток принимают участие компоненты тиолдисульфидной системы, а при ОС неизбежно активируются процессы окислительной модификации макромолекул и запуска апоптоза. В связи с этим, нам представилось целесообразным выяснить особенности участия компонентов тиолдисульфидной системы, ОМБ и их деградации в молекулярных механизмах формирования феномена «ускользания» от апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat, а также в молекулярных механизмах рецептор-опосредованного и митохондриального путей апоптоза в лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro*.

Дизрегуляция программированной гибели при опухолевой трансформации клеток опосредована изменением соотношения про- и антиапоптогенных белков, возникающим в результате последовательной активации редокс-зависимых элементов сигнальной трансдукции различными факторами внутри- и внеклеточного происхождения [95, 232, 287]. Несмотря на многочисленные исследования в области идентификации молекулярных мишеней с целью разработки технологий регулирования процесса программированной гибели клеток при опухолевом росте [37, 45, 100, 229, 230, 234, 431, 461, 480], проблема выяснения молекулярных механизмов дизрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии до сих пор сохраняет свою актуальность.

Запуск апоптотической программы гибели клеток осуществляется, благодаря появлению на поверхности мембран специфических молекул – кальций-зависимых фосфолипид-связывающих белков. В норме эти белки экспрессируются только с внутренней стороны плазматической мембраны и выполняют сигнальную функцию. Одним из таких белков является аннексин V, который способен связывать протеинкиназу C и моделировать ее активность. Показано, что ключевым признаком ранней стадии апоптоза можно считать потерю асимметрии между внутренним и внешним слоями плазматической мембраны по составу включенных фосфолипидов. Аннексин V имеет свойство образовывать комплекс с высокоаффинным фосфатидилсерином и способствовать

его презентации на плазматической мембране клеток. При этом данный факт установлен только для клеток со сниженным мембранным потенциалом. Поэтому это дало возможность V.A. Fadok и P.M. Henson (2003) сделать предположение о том, что снижение величины мембранного потенциала является ранним признаком апоптоза [170].

Для нормального функционирования и адекватного реагирования на изменения внешней и внутренней среды, поддержания гомеостаза всего организма клеткам необходимы плазматические рецепторы. Конформационные изменения структуры мембранных рецепторов определяют их сродство как к лигандам природного происхождения, так и к молекулам, полученным химическим синтезом [368, 513].

На возможную взаимосвязь между изменением в содержании АФК, фракций глутатиона и экспрессией плазматических рецепторов указывает особенность строения Fas-рецептора, а именно наличие трех внеклеточных доменов, обогащенных цистеином. Богатые цистеином и, соответственно, атомами серы последовательности в эволюционно-консервативных доменах плазматических рецепторов, обеспечивающих межклеточные, матрикс-клеточные и гуморально-клеточные взаимодействия (адрено-, холино- и дофаминовые рецепторы, интегрины, кадгерины, рецепторы ростовых факторов, интерферонов, интерлейкинов и др.), представляют собой потенциальные молекулярные мишени для селективного управления апоптозом [429]. Восстановленное состояние атома серы или ее участие в образовании дисульфидной связи в молекуле белков-рецепторов определяет функционально неактивную или функционально активную конформацию последних. С другой стороны, презентация плазматических рецепторов напрямую зависит от состояния фосфолипидов мембраны и интенсивности перекисного окисления липидов [179, 180, 307]. Кроме этого, АФК могут принимать непосредственное участие в активации специализированных белковых комплексов, таких как DISC, функционирование которых взаимосвязано с проведением смерть-индуцирующего сигнала через TNF RI и

Fas-рецепторы (рисунок 21) [235, 429, 494]. Т. Inoue и Y. Suzuki-Karasaki (2013) показали участие митохондрий посредством продукции супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в активации апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat с помощью TRAIL-домена рецептора смерти [240].

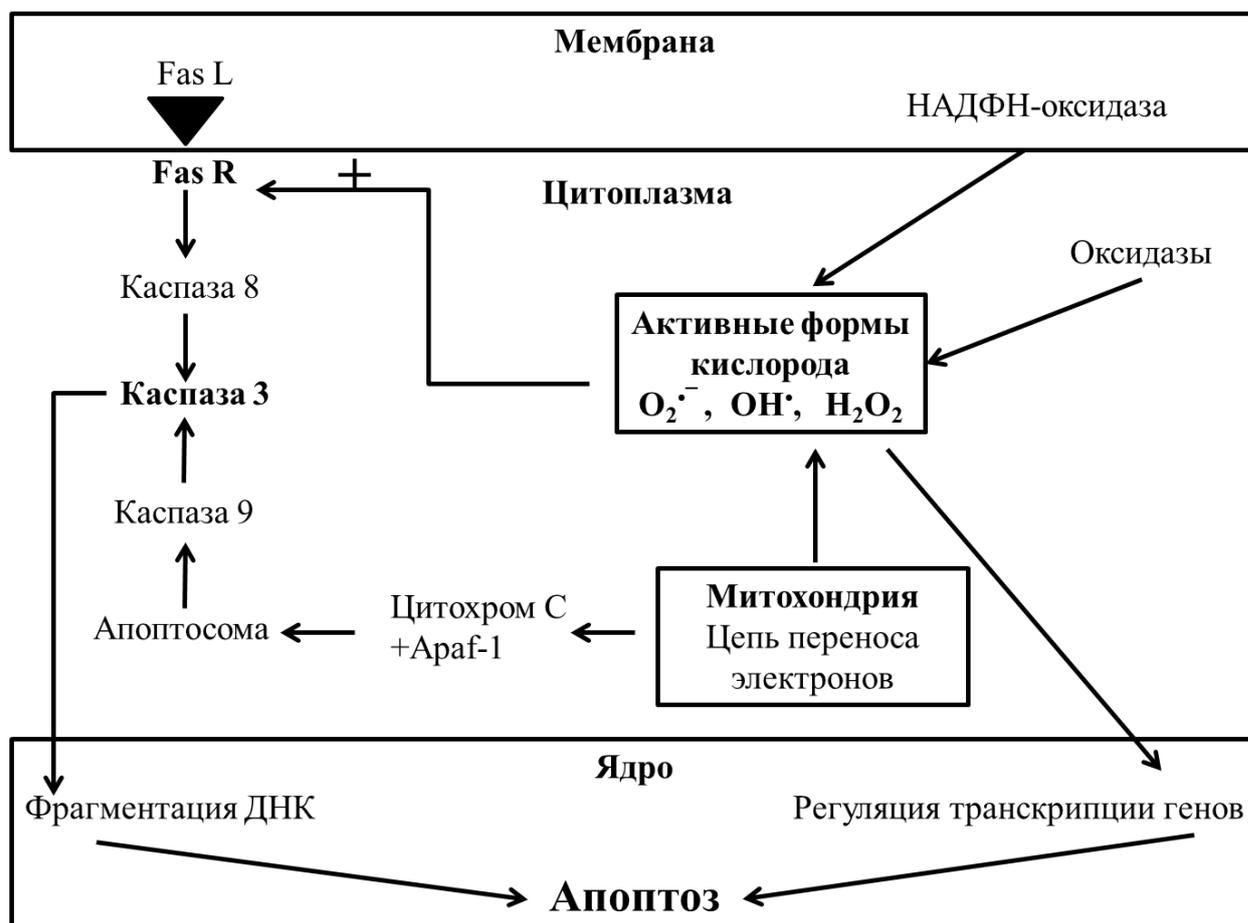


Рисунок 21 – Участие активных форм кислорода в активации рецепторного и митохондриального путей апоптоза (по данным [44, 88])

В представленной работе нами было получено снижение презентации Fas-рецепторов на плазматической мембране опухолевых клеток линии Jurkat по сравнению с их экспрессией на интактных лимфоцитах крови (таблицы 6, 9).

В низких концентрациях АФК рассматриваются с позиции молекулярных регуляторов внутриклеточного сигналинга [371, 457]. На сегодняшний день установлено наличие активирующего эффекта гидроксильного радикала на гуанилатциклазу в лимфоцитах крови, что позволяет его считать компонентом в системе передачи внешнего сигнала внутрь клетки [57]. Накопление АФК

приводит к повреждению макромолекул клетки и изменению активности метаболических процессов. Источниками АФК в клетках выступает электрон-транспортная цепь митохондрий (никотинамидадениндинуклеотид : убихинон-оксидоредуктазный и сукцинат : убихинон-оксидоредуктазный комплексы), оксидазы, мембранно-связанные НАДФН-оксидаза и ксантиноксидаза, а также электрон-транспортная система цитохрома P450 [40, 355]. В нормальных условиях в клетке постоянно поддерживается баланс между продукцией и утилизацией свободно-радикальных метаболитов. Интенсификация свободно-радикального окисления молекул, с одной стороны, является следствием снижения антиоксидантной защиты клетки, а, с другой стороны, причиной этого процесса. Увеличение уровня прооксидантов в опухолевых клетках способно приводить к активации свободно-радикального окисления, набуханию митохондрий, разобщению окислительного фосфорилирования наряду с успешным их выживанием [197].

Следует отметить, что в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и в лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro* содержание АФК, которое отражало уровень внутриклеточного пероксида водорода, было сопоставимым (таблицы 11, 12). Но, интактные опухолевые клетки линии Jurkat характеризовались более высокой концентрацией гидроксильного радикала относительно значений в лимфоцитах крови при моделировании ОС *in vitro* (таблицы 11, 12).

Генерация пероксида водорода в клетках в основном сопряжена с функционированием интрацеллюлярных ферментативных систем, которые локализованы в пероксисомах, либо с чрезмерной дисмутацией супероксидного анион-радикала. Установлено, что образование пероксида водорода может осуществляться за счет двухэлектронного восстановления кислорода, а одноэлектронное восстановление  $H_2O_2$  сопровождается генерацией  $OH^\bullet$ . Механизм повышенной продукции гидроксильного радикала в опухолевых клетках, вероятнее всего, связан со снижением значения рН и активной мобилизацией железа из белков [16, 357]. Гидроксильный радикал является

наиболее токсичным из АФК, проявляя прямое действие на клеточные биополимеры (в основном на белковые молекулы) [16, 19, 128]. Помимо цитотоксичности, он обладает мутагенным действием на ДНК, что крайне важно в плане передачи онкогенных свойств многим поколениям клеток [99].

Выбор опухолевой клеткой между выживанием и смертью при ОС зависит от выполнения митохондриями биоэнергетической функции. Снижение трансмембранного митохондриального потенциала может быть обусловлено увеличением проницаемости внутренней мембраны этих структур вследствие образования гигантских пор. Митохондрии, являясь одновременно и источником, и мишенью АФК [31, 299], содержат и про-, и антиапоптотические белки, что определяет ведущую роль этих органелл в реализации танатогенной программы клеток и развитии ОС [58, 67, 347]. Показателем целостности мембран служит электрохимический потенциал ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ), генерируемый в результате прохождения электронов по дыхательной цепи митохондрий, который определяется трансмембранным потенциалом ( $\Delta\psi$ ) и концентрационным градиентом протонов ( $\Delta\text{pH}$ ) [40]. Кроме этого, снижение  $\Delta\psi$  можно использовать для косвенного подтверждения запуска митохондриального пути апоптоза, так как изменение этого показателя напрямую сопряжено с выходом цитохрома С в цитозоль клетки, который в последующем может участвовать в образовании апоптосомы путем взаимодействия с транскрипционным фактором Araf-1 (рисунок 21).

В ходе проведенного исследования нами было установлено достоверно значимое увеличение количества интактных опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови, инкубированных в условиях ОС *in vitro*, со сниженным митохондриальным потенциалом на фоне гиперпродукции АФК. При этом лимфоциты крови, инкубированные в присутствии 0,5 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , более активно вступали в процесс апоптоза по сравнению с интактными опухолевыми клетками линии Jurkat на фоне сопоставимых значений содержания антиапоптотического фактора транскрипции NF- $\kappa\text{B}$  в этих клетках (таблицы 5, 8). Вероятнее всего,

снижение  $\Delta\psi$  происходило за счет открытия митохондриальных пор под действием гидроксильного радикала, окисляющего тиоловые группы цистеина белка внутренней мембраны митохондрий – АТФ/АДФ-антипортера, что, в свою очередь, превращало его в проницаемый неспецифический канал-пору, через который происходил выход протонов водорода,  $\text{Ca}^{2+}$  и проапоптотических белков. Это доказывают исследования, в которых установлено, что митохондриальная пора состоит из трех белков: транслоказы адениловых нуклеотидов, потенциал-зависимого анионного канала (порина) и бензодиазепинового рецептора. Указанные белки работают на связывающих сайтах внешней и внутренней мембраны митохондрий [194]. При связывании этого комплекса с  $\text{Ca}^{2+}$ , он способен пропускать вещества с небольшой молекулярной массой, что приводит к снижению  $\Delta\psi$  и набуханию матрикса митохондрий, в результате чего целостность внешней мембраны митохондрий неизбежно нарушается, из межмембранного пространства в цитоплазму выходят  $\text{H}^+$ , апоптоз-индуцирующие факторы, в том числе ряд каспаз-активирующих агентов [52, 117, 391], и происходит запуск митохондриального пути программированной гибели [116, 301]. Кроме этого, снижение  $\Delta\psi$  способствовало, по-видимому, формированию в опухолевых клетках линии Jurkat гипознергетического состояния. Поэтому можно предположить, что недостаток АТФ мог ингибировать фосфорилирование белков и, тем самым, способствовать их вовлечению в другие типы ковалентной модификации, такие как глутатионилирование и убиквитинилирование.

Неферментативной ловушкой свободных радикалов в клетке выступает GSH, который поставляет восстановленные тиоловые группы в реакциях антиоксидантной защиты [28, 126, 207]. Одновременно глутатион является кофактором для глутатионзависимых ферментов, которым принадлежит ведущая роль не только в реализации антиоксидантных процессов, но и в поддержании структуры и функций биологических мембран, обеспечении адекватного срабатывания рецепторного аппарата клетки. Восстановленный глутатион предотвращает окисление SH-групп или восстанавливает S–S-связи,

индуцированные ОС, инактивирует свободные радикалы [28]. В условиях развития ОС происходит неизбежное образование GSSG, который по сравнению с GSH, обладает большей реакционной способностью по отношению к белковым молекулам и играет главную роль в образовании смешанных дисульфидов с белками (глутатионилировании) (рисунок 22) [232].

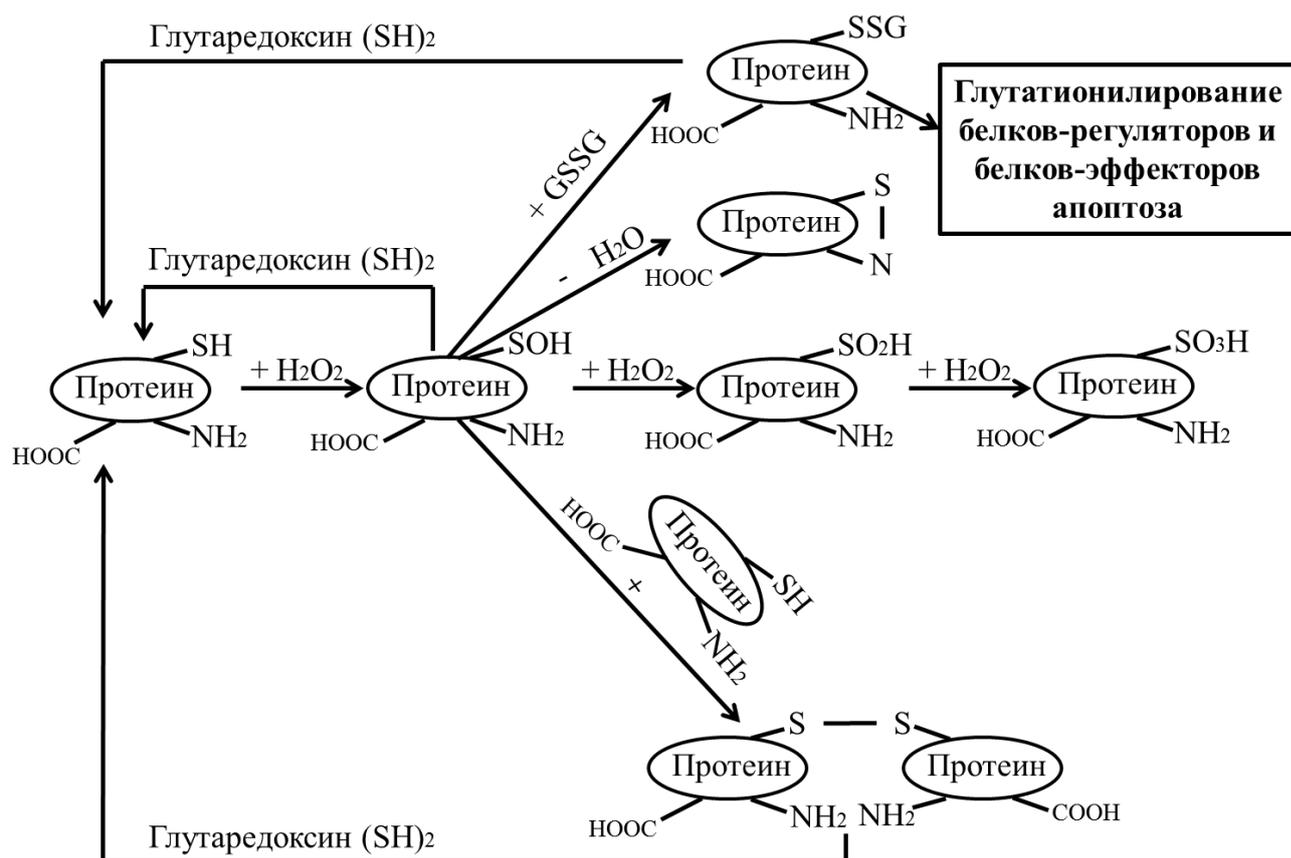


Рисунок 22 – Молекулярные механизмы глутатионилирования/деглутатионилирования белков-регуляторов и белков-эффекторов апоптоза в клетках (по данным [232] и результатам собственных исследований)

Примечание – GSSG – окисленный глутатион

Восстановленный глутатион в клетке обычно присутствует в концентрации 0,1-10,0 мМ и является самым распространенным низкомолекулярным пептидом [211]. В физиологических условиях повышение содержания GSH происходит в основном в результате более долговременных процессов: увеличения экспрессии мРНК и активности фермента синтеза глутатиона –  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазы [27], а также восстановления окисленной формы трипептида в сопряженной системе НАДФН/ГР. В условиях ОС уровень GSH определяется

преимущественно активностью ГР, а также глута-, перокси- и тиоредоксинами [24, 106, 383].

Нами было установлено достоверно значимое увеличение содержания как восстановленного, так и окисленного глутатиона, величины соотношения GSH/GSSG в лимфоцитах крови при ОС *in vitro* и в интактных опухолевых клетках линии Jurkat по сравнению с интактными лимфоцитами крови (таблицы 13, 14).

При этом внесение пероксида водорода в конечной концентрации 0,5 мМ в среду инкубирования лимфоцитов крови сопровождалось увеличением активности ГПО, благодаря реализации внутриклеточного резерва восстановленного трипептида в качестве одного из субстратов глутатионпероксидазной реакции (таблица 13). Соответственно, увеличение содержания окисленной фракции тиола в этих клетках может быть связано как и с возрастанием активности ГПО, так и с зафиксированным нами сопоставимым значением активности ГР по сравнению со значениями показателей в интактных лимфоцитах крови (таблица 13).

В интактных опухолевых клетках линии Jurkat возросший пул GSH приводил к достоверно значимому увеличению активности ГПО, а повышенная концентрация GSSG обеспечивалась достоверно значимым снижением активности ГР по сравнению с показателями как в интактных лимфоцитах крови, так и со значениями в лимфоцитах крови при ОС *in vitro* (таблицы 13, 14).

Одной из главных характеристик опухолевой прогрессии является длительная пролиферация клеток с нарушением их дифференцировки. Это свойство опухолевых клеток формируется, благодаря усиленной поставке дезоксирибонуклеотидов для построения ДНК с помощью окисления тиоредоксина, который нуждается в адекватном восстановлении за счет активности ТРР. Наряду с этим, в опухолевых клетках линии Jurkat повышение активности ТРР на фоне развития ОС обеспечивало поддержание уровня восстановленного тиоредоксина, необходимого для утилизации АФК. В ходе

проведенного исследования нами было установлено достоверно значимое повышение активности изучаемого фермента в интактных опухолевых клетках линии Jurkat по сравнению со значениями данных параметров в интактных лимфоцитах крови и лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro* (таблицы 13, 14). Зафиксированное нами достоверно значимое повышение активности ТРР в лимфоцитах крови при ОС *in vitro*, вероятнее всего, происходит за счет усиленного восстановления тиоредоксина, который использовался для утилизации повышенной продукции АФК.

В опухолевой клетке в условиях ОС активно происходит окислительная модификация макромолекул, в том числе белков [69]. Согласно современным представлениям, окислительной модификации могут подвергаться все остатки аминокислот в белках, но наиболее чувствительными являются остатки триптофана, тирозина, гистидина и цистеина [17, 482]. В настоящее время установлено, что ОМБ приводит к появлению метаболитов, которые могут служить причиной вторичного повреждения других биомолекул [17, 439, 449]. Белковая молекула, поврежденная гидроксильным радикалом, содержит большое количество пероксидов и может легко вступать во взаимодействие с восстановленной формой глутатиона [276]. Окислительно-модифицированные протеины, в том числе компоненты цепи переносчиков электронов, АТФ-синтаза изменяют ферментативную активность, вызывая потерю электронов из электрон-транспортной системы, разобщение окислительного фосфорилирования и гипоэнергетическое состояние [337]. Несмотря на это, опухолевые клетки активно «ускользают» от запрограммированной гибели и успешно выживают. В этой связи нам представилось интересным изучить некоторые особенности ОМБ и сопоставить полученные данные с показателями реализации и регуляции апоптоза в интактных лимфоцитах крови, лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro* и в опухолевых клетках линии Jurkat. В результате проведенного исследования нами было установлено достоверно значимое увеличение содержания белково-связанного глутатиона и КПБ на фоне снижения концентрации SH-групп белков в

лимфоцитах крови при ОС *in vitro* и в интактных опухолевых клетках линии Jurkat по сравнению со значениями данных показателей в интактных лимфоцитах крови (таблицы 15, 16). Следует отметить, что в интактных опухолевых клетках линии Jurkat концентрация белково-связанного глутатиона и SH-групп белков была достоверно выше, чем в лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro* (таблицы 15, 16). Кроме этого, в интактных опухолевых клетках линии Jurkat нами было получено достоверно значимое увеличение содержания окисленного триптофана и битирозина по сравнению с результатами, полученными при оценке интактных лимфоцитов крови (таблицы 15, 16). Окислительная модификация протеинов способна приводить к агрегации и деградации молекул данных белков. Необратимое повреждение белковых молекул в интактных опухолевых клетках линии Jurkat сопровождалось достоверно значимым увеличением уровня экспрессии мРНК гена и концентрации убиквитина, относительно результатов в интактных лимфоцитах крови, что косвенно указывало на его активное использование в убиквитинлигазной реакции (таблицы 17, 18).

Полученные нами данные, вероятно, свидетельствуют о формировании ОС и несостоятельности Hsp27 и Hsp70 в обеспечении адекватной скорости рефолдинга протеинов в интактных опухолевых клетках линии Jurkat (таблицы 7, 10, 11, 12). Поэтому повышенная экспрессия мРНК гена убиквитина в опухолевых клетках по сравнению с интактными лимфоцитами крови необходима для обеспечения адекватной скорости деградации ОМБ на протеасомах после предварительного убиквитинилирования. Реакция убиквитинилирования осуществляется каскадом ферментов, обеспечивающих ковалентное присоединение убиквитина к окисленному протеину [423]. Молекула убиквитина присоединяется к остатку лизина, который находится внутри последовательности белка-мишени. При этом, дополнительное фосфорилирование окисленного протеина или его взаимодействие с белками теплового шока облегчает процесс убиквитинилирования [111, 219, 321, 452, 497]. Деграционные сигналы обычно

представлены в виде небольших аминокислотных последовательностей внутри белка-мишени, которые богаты серином, пролином, триптофаном, глутаматом и аспаратом. В качестве мишени для убиквитинилирования могут выступать не только ОМБ, но и короткоживущие белки, например, факторы транскрипции, регулирующие программированную гибель клеток, онкобелки, супрессоры опухолей и циклины [146, 238, 370, 406, 484, 485, 505]. Так, например, активация антиапоптотического фактора транскрипции NF-κB находится под контролем убиквитин-зависимых протеасом после предварительного фосфорилирования IκB [62, 140, 243, 331]. С другой стороны, установленная нами повышенная концентрация убиквитина в опухолевых клетках могла быть использована для обеспечения моноубиквитинилирования белка-мишени. В ряде случаев получение белком убиквитиновой метки служит сигналом к модификации или к изменению локализации в клетке [125, 257, 352, 495]. Причем множественное моноубиквитинилирование по нескольким остаткам лизина белка-мишени приводит к эндоцитозу в лизосомы с последующей деградацией [96, 467]. Кроме этого, в клетках существует семейство белков с высокой специфичностью к убиквитину, которые осуществляют деубиквитинилирование и, тем самым, регулируют период жизни белков, в том числе белков-регуляторов апоптоза [254, 255, 369, 444].

Проведенный нами корреляционный анализ полученных результатов в интактных опухолевых клетках линии Jurkat позволил установить отрицательные взаимосвязи между количеством аннексин-положительных клеток и содержанием убиквитинлигазы ( $r = -0,81$ ;  $p < 0,05$ ), числом TNF RI-положительных клеток и концентрацией убиквитинлигазы ( $r = -0,83$ ;  $p < 0,05$ ), числом Fas-позитивных клеток и содержанием убиквитина ( $r = -0,86$ ;  $p < 0,05$ ). Таким образом, установленная нами высокая концентрация убиквитина и убиквитинлигазы способствовали, по-видимому, сниженной презентации апоптоз-индуцирующих рецепторов и аннексина V на плазматической мембране, тем самым, опосредуя

формирование феномена «ускользания» от апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.

Кроме этого, опираясь на полученные результаты, можно сделать предположение об участии глутатионилирования белков в ингибировании апоптоза интактных опухолевых клеток линии Jurkat, так как накопление КПБ в опухолевых клетках сопровождалось увеличением концентрации белково-связанного глутатиона на фоне снижения числа аннексин-положительных клеток и активности каспазы-3 относительно показателей в интактных лимфоцитах крови (таблицы 5, 8, 15, 16).

Ввиду того, что апоптоз является мультиферментативным процессом, который находится под контролем белковых факторов транскрипции, в настоящее время окисление SH-групп белковых доменов активно рассматривается с позиции одного из ведущих молекулярных механизмов регуляции функциональной активности белков-эффекторов и белков-регуляторов апоптоза. Так, экспериментально доказано, что АФК регулируют связывание факторов транскрипции с ДНК путем прямого или опосредованного модулирования редокс-статуса цистеиновых радикалов аминокислот [330, 332]. С другой стороны, активность факторов транскрипции регулируется с помощью ковалентной модификации белковой молекулы путем фосфорилирования. Уровень фосфорилирования белков внутри клетки зависит от адекватной продукции АТФ митохондриями, активности протеинкиназ и протеинфосфатаз [40, 351]. В свою очередь, эти ферменты сами подвергаются редокс-регуляции и глутатионилированию [178, 218].

Большой интерес для нас представляло определение внутриклеточной активности каспазы-3, как маркера завершенности апоптоза. Этот фермент относят к редокс-регулируемым белкам-эффекторам апоптоза [315, 383]. В ходе проведенных исследований нами было установлено достоверно значимое увеличение активности фермента в лимфоцитах крови, инкубированных в присутствии 0,5 мМ  $H_2O_2$ , и снижение – в интактных опухолевых клетках линии

Jurkat на фоне увеличения концентрации АФК и гидроксильного радикала по сравнению с показателями в интактных лимфоцитах крови (таблицы 5, 8, 11, 12). Выявленное разнонаправленное поведение фермента в лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro* и в интактных опухолевых клетках линии Jurkat позволяет предположить наличие особенностей в молекулярных механизмах регуляции активности этого белка. Полученные нами данные косвенно подтверждают результаты D.A. Mitchell и соавторов (2007), которые показали в опухолевых клетках линии Jurkat апоптоз-ингибирующий эффект тиоредоксина на прокаспазу-3 [470]. Помимо этого, в регуляции активности каспазы-3 можно предположить участие NO<sup>•</sup>. Вероятнее всего, лимфоциты крови и опухолевые клетки линии Jurkat характеризуются разным исходным уровнем NO<sup>•</sup>, а также разным соотношением содержания отдельных АФК. Известно, что при низких концентрациях этот радикал ингибирует апоптоз, стабилизируя целостность клеток, но при высоком содержании NO<sup>•</sup> проявляется проапоптотический эффект, связанный с непосредственной деградацией ДНК. Так, NO<sup>•</sup> рассматривают в качестве антиапоптотического регулятора на уровне каспазы-3 *in vivo* [17].

При изучении концентрации белков-регуляторов апоптоза NF-κB и Araf-1, нами было получено достоверно значимое увеличение их содержания в интактных опухолевых клетках линии Jurkat по сравнению с концентрацией в интактных лимфоцитах крови. На наличие редокс-регулируемого механизма активации белка-регулятора Araf-1 при опухолевой прогрессии указывала установленная нами с помощью корреляционного анализа положительная взаимосвязь между величиной соотношения GSH/GSSG и содержанием транскрипционного фактора Araf-1 ( $r = +0,89$ ;  $p < 0,05$ ) в интактных опухолевых клетках линии Jurkat.

Реализация запрограммированной гибели в клетках во многом сводится к изменению направленности ферментативных реакций, активации/инактивации факторов транскрипции в результате белок-белковых взаимодействий [314, 449].

Вследствие чрезмерной генерации АФК неизбежно происходит повреждение белков-регуляторов и белков-эффекторов апоптоза, которые нуждаются в своевременном рефолдинге [82, 110, 245].

Белки теплового шока относятся к молекулам, синтез которых индуцируется стрессом [216]. Это высококонсервативные, высокоомологичные между эукариотами и прокариотами белки, экспрессия которых обнаруживается в клетках всех организмов [34, 311, 402, 462]. Уровень экспрессии Hsp зависит от типа клеток. Белки теплового шока 27 и 70 относят к индуцибельным белкам, которые проявляют шаперонную активность, участвуют в процессах транспорта молекул, фолдинга, рефолдинга и утилизации внутриклеточных протеинов [226, 310, 462].

Ведущим участником рефолдинга протеинов принято считать Hsp70 [226]. Он играет большую роль в распознавании поврежденных белков с целью их дальнейшей репарации или деградации, в том числе убиквитин-зависимой. Для активации Hsp70 необходим кошаперон – Bag-1, основная функция которого заключается в обеспечении функциональной активности шаперона путем замены АДФ на АТФ в комплексе – Hsp70-Bag-1/белковый субстрат, что приводит к высвобождению субстрата для дальнейшей протеасомной деградации [227]. Содержание Hsp70 увеличивается при ОС [208, 226, 310, 463].

Шаперонная активность Hsp27 проявляется в образовании комплекса с субстратами, которые подверглись частичной денатурации или имели неправильную конформацию молекулы, с последующим их взаимодействием с АТФ-зависимыми шаперонами, в основном Hsp70 и Hsp90 [226, 462].

Кроме этого, белки теплового шока относят к молекулам, которые оказывают модулирующий эффект на реализацию апоптоза [98, 216, 226].

Ввиду того, что TNF RI- и Fas-рецепторы относятся к мембранным гликопротеинам I типа, а их презентация на плазматической мембране осуществляется путем приобретения гидрофобной частью белковой молекулы правильной конформации, образованием сложных молекулярных

комплексов, перемещением и встраиванием в фосфолипидный бислой клетки, поэтому для создания и поддержания функционально-способной конформации этих молекул клетка использует механизмы, обеспечивающие фолдинг, а в условиях ОС и рефолдинг [180]. Кроме этого, формирование ОС способствует пероксидации ненасыщенных жирных кислот мембранных фосфолипидов. В результате этого образуются стабильные токсические альдегиды – 4-гидрокси-2-ноненали, 4,5-эпокси-2-алкенали и акролеин [268, 328, 506]. 4-гидрокси-2-ноненали способны реагировать с амино-, имидазольными и SH-группами аминокислотных остатков белков, изменяя их нативную структуру [510]. 4,5-эпокси-2-алкенали образуют пирролпроизводные белков с последующей их полимеризацией [221]. Акролеин, путем модификации преимущественно лизиновых, гистидиновых остатков аминокислот белков, индуцирует карбонилирование протеинов [506]. Таким образом, интенсивность перекисного окисления липидов мембраны контролирует процесс презентации смерть-индуцирующих рецепторов клетки.

В ходе проведенного исследования нами было установлено достоверно значимое увеличение содержания Hsp27 и Hsp70 в интактных опухолевых клетках линии Jurkat относительно показателей в интактных лимфоцитах крови; кроме этого, опухолевые клетки характеризовались достоверно значимым возрастанием концентрации Hsp70 по сравнению с результатами, полученными при исследовании лимфоцитов крови при ОС *in vitro* (таблицы 7, 10). Проведенный корреляционный анализ полученных результатов в интактных опухолевых клетках линии Jurkat позволил установить отрицательную взаимосвязь между количеством Fas-положительных клеток и содержанием Hsp27 ( $r = -0,83$ ;  $p < 0,05$ ). Вероятнее всего, установленный факт указывал на то, что повышенное содержание Hsp27 позволяло опухолевым клеткам линии Jurkat включать механизмы ингибирования апоптоза, что проявлялось в виде снижения презентации апоптоз-индуцирующего Fas-рецептора. Полученные нами результаты гиперпродукции Hsp27 в опухолевых клетках линии Jurkat по

сравнению с лимфоцитами крови, согласуются с данными литературы [39, 98, 132, 213]. Наличие высокого уровня Hsp70 может ассоциироваться с низкой степенью дифференцировки опухолевых клеток, способностью к метастазированию в лимфатические узлы и ингибированием апоптоза [132, 226]. Так, проведенный нами корреляционный анализ полученных результатов в интактных опухолевых клетках линии Jurkat позволил установить положительную взаимосвязь между содержанием транскрипционного фактора Araf-1 и Hsp70 ( $r = +0,83$ ;  $p < 0,05$ ). Вероятнее всего, гиперпродукция Hsp70 позволяла ингибировать проапоптотический эффект Araf-1 и, тем самым, способствовала «ускользанию» опухолевых клеток линии Jurkat от запрограммированной гибели.

Исследования в области патофизиологии и биохимии, посвященные роли компонентов тиолдисульфидной системы, ОМБ и убиквитин-зависимого пути деградации протеинов в регуляции запрограммированной гибели опухолевых клеток, имеют особую значимость для выявления молекулярных мишеней таргетной терапии злокачественных новообразований.

На основании результатов исследования, проведенного нами на модели ОС *in vitro* в лимфоцитах крови, можно сделать вывод, что компоненты тиолдисульфидной системы и ОМБ задействованы в регуляции и реализации как рецептор-опосредованного, так и митохондриального пути апоптоза изучаемых клеток (рисунок 23). Но, несмотря на то, что гиперпродукция АФК в клетках описывается как маркер апоптоза [240, 339, 353, 382], роль редокс-статуса, ОМБ и убиквитин-зависимой деградации протеинов в регуляции запрограммированной гибели при опухолевой прогрессии остаются до конца не изученными.

В ходе настоящего исследования четко показано активирующее действие АФК на запуск апоптоза и активацию каспазы-3 в лимфоцитах крови в условиях ОС *in vitro*. Напротив, в опухолевых клетках линии Jurkat гиперпродукция АФК сопровождалась, наоборот, активным ингибированием апоптоза. Кроме

того, полученные результаты позволяют сделать предположение о возможном участии глутатионилирования и убиквитинилирования в регуляции презентации TNF RI и Fas-рецепторов на плазматической мембране, активности белков-регуляторов – NF-κB, Araf-1 и белка-эффиктора – каспазы-3 в опухолевых клетках линии Jurkat.

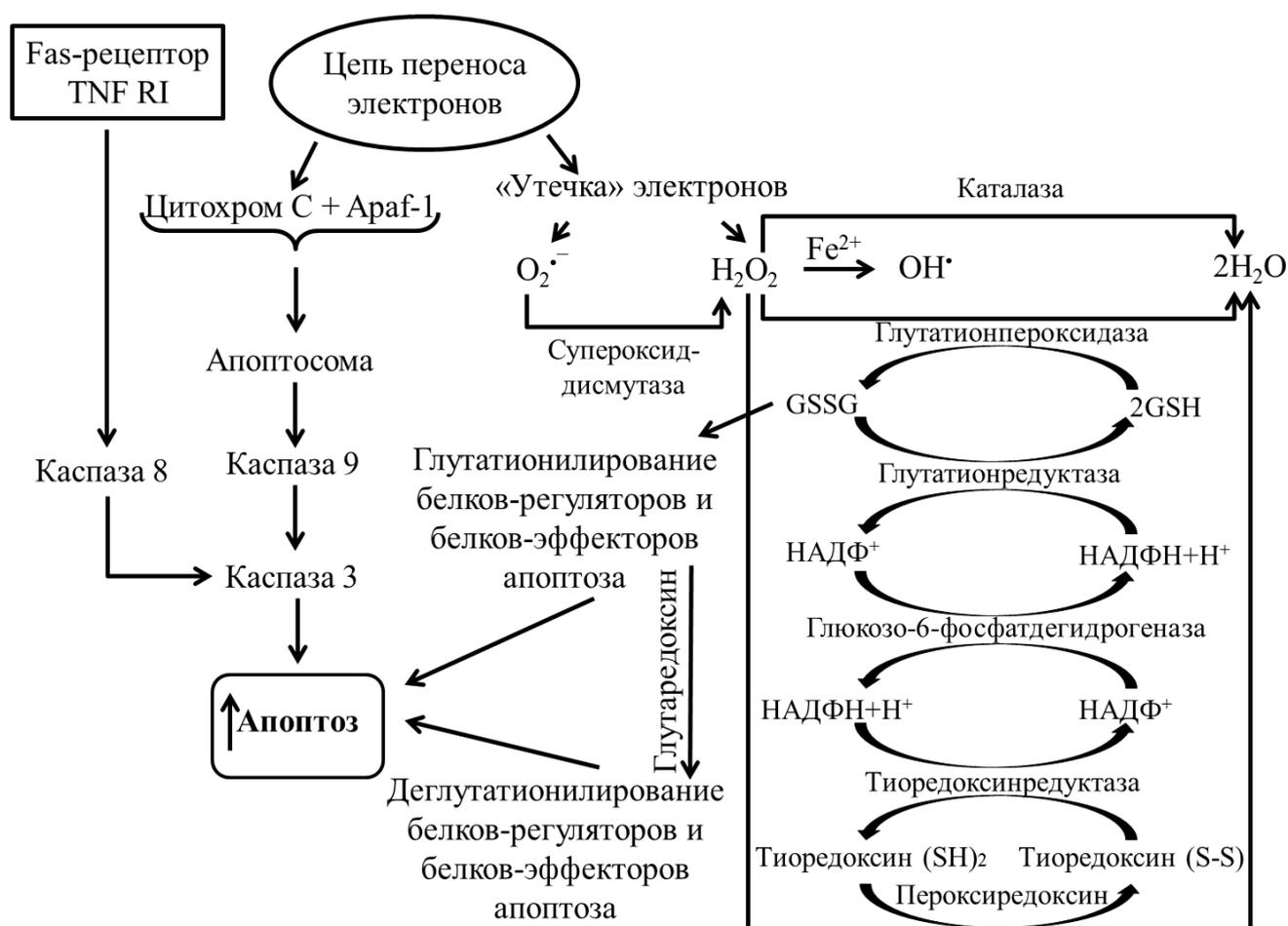


Рисунок 23 – Участие компонентов тиолдисульфидной системы в реализации и регуляции апоптоза клеток (по данным [28, 279])

Таким образом, дисрегуляция механизмов программированной гибели при опухолевой прогрессии опосредована изменением редокс-статуса, нарушением функционирования тиолдисульфидной системы и окислительной модификацией белков-регуляторов и белков-эффикторов апоптоза на фоне сформированного ОС.

## 4.2 Роль компонентов тиолдисульфидной системы, окислительной модификации белков и убиквитин-зависимой деградации в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat

Для выяснения молекулярных механизмов участия ОМБ и убиквитин-зависимого пути деградации протеинов, компонентов тиолдисульфидной системы в дизрегуляции апоптоза при опухолевом росте, на следующем этапе диссертационного исследования нами было выполнено моделирование редокс-статуса опухолевых клеток линии Jurkat с помощью внесения в среду культивирования блокатора SH-групп пептидов и протеинов – NEM в конечной концентрации 5 мМ, ингибитора синтеза глутатиона *de novo* – BSO в конечной концентрации 1 мМ и протектора SH-групп пептидов и белков – DTE в конечной концентрации 5 мМ. В случае применения блокатора SH-групп пептидов и белков, а также ингибитора синтеза глутатиона *de novo* в опухолевых клетках линии Jurkat нами был получен клеточный ответ в виде достоверно значимого снижения концентрации SH-групп протеинов и GSH по сравнению со значениями, полученными при оценке интактных опухолевых клеток (таблицы 13, 14, 15, 16, 19).

Внесение в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat протектора SH-групп пептидов и белков сопровождалось достоверно значимым увеличением только содержания SH-групп протеинов относительно значений в интактных опухолевых клетках (таблицы 15, 16, 19). Кроме этого, с целью выяснения роли Hsp27 в поддержании функциональной активности компонентов тиолдисульфидной системы, рефолдинге протеинов и в процессах «ускользания» от апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat в среду культивирования вносили ингибитор Hsp27 – KRIBB3 в конечной концентрации 0,1 мкМ. При этом в опухолевых клетках линии Jurkat нами было получено достоверно значимое

снижение содержания Hsp27 относительно значений в интактных опухолевых клетках (таблицы 7, 10, 20).

Таблица 19 – Влияние редокс-модуляторов (N-этилмалеимид, 1,4-дитиоэритритол, бутионин-сульфоксимин), ингибитора белка теплового шока 27 (5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол) и индуктора апоптоза (дексаметазон) на компоненты тиолдисульфидной системы, окислительную модификацию белков и убиквитин-зависимую деградацию опухолевых клеток линии Jurkat (по результатам собственных исследований)

	Опухолевые клетки линии Jurkat, культивированные при добавлении				
	DEX	NEM	DTE	BSO	KRIBB3
Содержание восстановленного глутатиона		↓	↓	↓	
Содержание окисленного глутатиона					↑
Величина соотношения восстановленного глутатиона к окисленному	↓	↓	↓	↓	↓
Активность глутатионредуктазы	↑	↓			↑
Активность тиоредоксинредуктазы	↓		↓	↓	↓
Содержание белково-связанного глутатиона	↓			↓	↓
Содержание карбонильных производных белков	↑	↑	↓	↑	↑
Содержание окисленного триптофана			↓	↓	↓
Содержание битирозина			↓		
Содержание убиквитина	↓	↓	↓	↓	↓
Содержание убиквитинлигазы	↑	↑	↓	↓	↑

Примечание – Здесь и в таблице 20: ↑ активирующий эффект, ↓ ингибирующий эффект; DEX – дексаметазон, NEM – N-этилмалеимид, DTE – 1,4-дитиоэритритол, BSO – бутионин-сульфоксимин, KRIBB3 – 5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол

В качестве «положительного контроля» для индукции программированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat в среду культивирования вносили DEX в конечной концентрации 10 мкМ.

Таблица 20 – Влияние редокс-модуляторов (N-этилмалеимид, 1,4-дитиоэритритол, бутионин-сульфоксимин), ингибитора белка теплового шока 27 (5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол) и индуктора апоптоза (дексаметазон) на рецепторный и митохондриальный пути программированной клеточной гибели опухолевых клеток линии Jurkat (по результатам собственных исследований)

	Опухолевые клетки линии Jurkat, культивированные при добавлении				
	DEX	NEM	DTE	BSO	KRIBB3
Презентация фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны	↑	↑	↑	↑	↑
Презентация Fas-рецептора	↑	↑	↑	↑	↑
Презентация TNF RI	↑	↑		↑	↑
Активность каспазы-3	↑	↑	↑	↑	↑
Содержание транскрипционного фактора Araf-1	↑	↑	↓	↓	↓
Содержание транскрипционного фактора NF-κB		↑	↑	↑	↑
Содержание Hsp27	↓	↓	↑		↓
Содержание Hsp70	↓	↓	↓	↓	
Трансмембранный митохондриальный потенциал Δψ	↑	↑	↑	↑	↑

Необходимо отметить, что усиленная продукция АФК и гидроксильного радикала в опухолевых клетках линии Jurkat наблюдалась при добавлении в среду культивирования DEX или NEM, или BSO, или KRIBB3, а в присутствии DTE нами были получены сопоставимые значения изучаемых показателей относительно значений в интактных клетках (таблицы 11, 12, 19). Однако, при всех описанных воздействиях нами было установлено достоверно значимое

увеличение числа аннексин-положительных опухолевых клеток линии Jurkat по сравнению с количеством интактных опухолевых клеток. Поэтому целесообразным представилось изучить более детально процесс реализации и регуляции апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat.

До сих пор нет однозначного мнения о роли антиоксидантного статуса, системы глутатиона и тиоредоксина в редокс-зависимых механизмах опухолевой трансформации клеток [78, 186, 191, 382, 459]. Представленное исследование было направлено на оценку молекулярных взаимосвязей между изменениями состояния тиолдисульфидной системы и активности белков, принимающих участие в апоптозе опухолевых клеток линии Jurkat.

Восстановленный глутатион является полифункциональным тиолом, который играет важную роль во многих внутриклеточных процессах: синтез белков; редокс-регуляция экспрессии генов и активности факторов транскрипции; детоксикация ксенобиотиков, восстановление гидроперекисей липидов [5, 19, 24, 47, 84, 95, 354]. Кроме этого, GSH снижает деструктивное и цитотоксическое действие АФК при ОС путем инактивации свободных радикалов, предотвращения окисления SH-групп, восстановления S-S-связей. SH-группа этого соединения окисляется гораздо легче, чем SH-группы в белковых молекулах, и, таким образом, реализуется защита биополимеров от окислительной модификации [84, 126]. Рядом авторов показано, что ингибирование синтеза глутатиона *de novo* с помощью BSO в нормальных клетках сопровождалось снижением вероятности малигнизации клетки. А применение BSO в опухолевой клетке активировало ее вступление в апоптоз [191].

При изучении уровня восстановленной и окисленной формы тиола в опухолевых клетках линии Jurkat нами было получено достоверно значимое снижение концентрации GSH при внесении как блокатора SH-групп пептидов и протеинов, ингибитора синтеза трипептида *de novo*, так и протектора SH-групп пептидов и белков по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках (таблицы 13, 14, 19). Следует отметить, что ингибирование Hsp27 с помощью

KRIBB3 и индукция апоптоза – DEX в опухолевых клетках линии Jurkat характеризовались сопоставимыми значениями содержания GSH в интактных опухолевых клетках. Кроме этого, возрастание концентрации GSSG в опухолевых клетках линии Jurkat по сравнению с результатом в интактных опухолевых клетках вызывало ингибирование Hsp27. Добавление DEX к редокс-модуляторам, а также ингибитору Hsp27 в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat сопровождалось еще большим снижением содержания GSH и GSSG по сравнению с показателем в интактных опухолевых клетках (таблицы 13, 14).

В ходе проведенного исследования нами было установлено достоверно значимое снижение активности ГР и сопоставимые показатели активности ГПО и ТРР в опухолевых клетках линии Jurkat при блокировании SH-групп пептидов и протеинов по сравнению с показателем в интактных опухолевых клетках (таблицы 13, 14, 19). На достоверно значимое снижение концентрации GSH, в этом случае воздействия на опухолевые клетки линии Jurkat, влияла низкая активность ГР.

В случае применения DTE или BSO в опухолевых клетках линии Jurkat нами были получены сопоставимые результаты активности ГР и ГПО, а также достоверно значимое снижение активности ТРР по сравнению с интактными опухолевыми клетками (таблицы 13, 14, 19).

При внесении в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat индуктора апоптоза и/или ингибитора Hsp27 нами было получено достоверно значимое увеличение активности ГР и снижение активности ТРР относительно показателей в интактных опухолевых клетках (таблицы 13, 14, 19). Установленный факт снижения активности ТРР на фоне повышения активности ГР может быть связан с усиленным отвлечением НАДФН в процесс восстановления GSSG и пополнения пула GSH, так как именно повышенная активность ГР позволила поддерживать содержание GSH, а, следовательно, и активность ГПО, которая использовала его в качестве одного из субстратов своей

реакции, на сопоставимом уровне с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 13, 14). Кроме этого, необходимо отметить, что ни при редокс-модуляции, ни при ингибировании Hsp27 в опухолевых клетках линии Jurkat нами не установлено достоверно значимых различий в активности ГПО по сравнению со значением в интактных опухолевых клетках (таблицы 13, 14, 19).

Важно отметить, что внесение в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat DEX и NEM, DEX и BSO приводило к дисбалансу состояния тиолдисульфидной системы и вовлечению изучаемых клеток в апоптоз (таблицы 8, 14).

При изучении роли изменения редокс-статуса клеток, концентрации глутатиона и Hsp27 в механизмах рецептор-опосредованной активации апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat нами было установлено стимулирующее влияние на презентацию TNF RI и Fas-рецепторов применения DEX и/или NEM, BSO, KRIBB3; кроме этого, в случае внесения DTE в культуральную среду, происходила только стимуляция экспрессии Fas-рецепторов по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках (таблицы 6, 9, 20). На прямое участие в механизме презентации TNF RI редокс-статуса указывало наличие отрицательной корреляционной взаимосвязи между величиной соотношения GSH/GSSG и числом TNF RI-положительных опухолевых клеток линии Jurkat в условиях индукции апоптоза с помощью DEX ( $r = -0,94$ ;  $p < 0,05$ ). Таким образом, можно предположить, что основой редокс-сигнализации являются свободные сульфгидрильные группы рецепторных молекул. При определении числа опухолевых клеток со сниженным митохондриальным потенциалом в условиях применения DEX и/или NEM, DTE, BSO, KRIBB3 нами было установлено достоверно значимое увеличение показателя по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках (таблицы 5, 8, 20). Это доказывало наличие «утечки» электронов из цепи переноса электронов митохондрий, что приводило к повышению уровня АФК, в том числе и гидроксильного радикала в опухолевых клетках линии Jurkat.

Запуск программированной гибели клеток требует кооперации целого ряда молекул: рецепторов, белков-регуляторов и белков-эффекторов. В условиях применения NEM или DTE, или BSO, или KRIBB3 в опухолевых клетках линии Jurkat нами было получено увеличение концентрации NF-κB по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 5, 8, 20). Увеличение содержания транскрипционного фактора Araf-1 зафиксировано в случае присутствия в среде культивирования опухолевых клеток линии Jurkat индуктора апоптоза и блокатора SH-групп пептидов и белков, а при внесении протектора SH-групп пептидов и протеинов, ингибитора Hsp27 или синтеза глутатиона *de novo* – установлено достоверно значимое снижение содержания изучаемого белка-регулятора апоптоза по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках (таблицы 5, 8, 20). При проведении корреляционного анализа показателей опухолевых клеток линии Jurkat в условиях присутствия в среде культивирования DTE нам удалось установить положительную взаимосвязь между содержанием белково-связанного глутатиона и транскрипционного фактора NF-κB ( $r = +0,89$ ;  $p < 0,05$ ). Установленный факт взаимосвязи может свидетельствовать об участии глутатионилирования в активации этого фактора транскрипции.

Оценку завершенности апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat в условиях применения ингибиторного анализа проводили с помощью анализа активности каспазы-3. Так, нами был установлен активирующий эффект на каспазу-3 как модуляции редокс-статуса, так и ингибирования Hsp27. G.L. Zhang и соавторы (2015) установили у глутатиона ингибирующий эффект на активность каспазы-3 в опухолевых клетках линии Jurkat [339]. A. C. Wu и соавторы (2010) показали участие тиоредоксина и TRP в регуляции каспазы-3 в клетках HeLa путем S-нитрозилирования и денитрозилирования [383].

Нами было зафиксировано увеличение содержания транскрипционного фактора Araf-1 и активности каспазы-3 относительно показателей в интактных опухолевых клетках в случае действия блокатора SH-групп пептидов и протеинов или индуктора апоптоза, что позволило предположить активацию

митохондриального пути программированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat (таблицы 5, 8, 20). При внесении в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat протектора SH-групп пептидов и белков, а также ингибитора Hsp27 или синтеза глутатиона *de novo* этот эффект отсутствовал, так как происходило увеличение активности каспазы-3 на фоне снижения концентрации проапоптотического фактора транскрипции (Araf-1) и повышения содержания антиапоптотического белка-регулятора апоптоза (NF-κB) (таблицы 5, 8, 20).

Основные процессы, определяющие метаболизм и функциональную активность клеток, обеспечиваются за счет белковых мультиферментных комплексов, в том числе запуск и реализация программированной гибели. Устойчивость к действию проапоптотических факторов – одна из главных особенностей опухолевых клеток. Кроме этого, отсутствие чувствительности опухолевых клеток к триггерным механизмам программированной гибели основано на их способности успешно существовать в условиях ОС. Данное исследование обусловлено поиском взаимосвязей между нарушениями редокс-статуса, ОМБ, их деградации и дизрегуляцией апоптотической гибели в условиях ОС при опухолевой прогрессии. Мишенью АФК, в первую очередь, являются белковые молекулы клетки – ферменты, белки цитоскелета, рецепторы, факторы транскрипции и т. д. [372, 386, 500]. В силу особенностей своего строения белковые молекулы являются потенциальными ловушками АФК, а внутриклеточный уровень ОМБ фактически отражает соотношение между скоростью окисления белков и скоростью деградации окисленных протеинов. В связи с разнообразным химическим строением и особенностями пространственной структурной организации белковых молекул, процесс окислительной модификации протеинов сложен.

Эффективность окислительной модификации цистеиновых остатков определяется их низким потенциалом ионизации и в значительной степени зависит от структурной организации белковой молекулы [15]. В ходе окисления цистеинового остатка последовательно образуются производные сульфеновой,

сульфиновой и сульфоновой кислот. Сульфеновые производные могут либо окисляться дальше до сульфиновых, либо образовывать смешанные эфиры с цистеином или глутатионом (рисунок 18) [31, 232]. В отличие от карбонилирования протеинов и окисления остатков других аминокислот, окисление цистеинового остатка является обратимым процессом. Дисульфидная связь может быть восстановлена с участием глутаредоксинов. Возможность циклического окисления-восстановления остатков цистеина в белках составляет молекулярную основу их функционирования в качестве регуляторов внутриклеточных процессов [223, 386, 438, 455].

В ходе проведенного исследования в опухолевых клетках линии Jurkat нами было показано достоверно значимое снижение концентрации белково-связанного глутатиона при внесении в среду инкубации индуктора апоптоза, а также ингибитора Hsp27 или синтеза глутатиона *de novo* по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 15, 16, 19). Также, аналогичный эффект был зафиксирован при добавлении в среду культивирования DEX и NEM, DEX и BSO, DEX и DTE, DEX и KRIBB3 по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 15, 16). Так, при ингибировании синтеза глутатиона *de novo* или блокировании SH-групп пептидов и протеинов в опухолевых клетках линии Jurkat нами получено ожидаемое снижение определяемого показателя, а ингибированием Hsp27 в изучаемых клетках было косвенно доказано участие этого шаперона в снижении интенсивности глутатионилирования белков.

При оценке содержания КПБ в опухолевых клетках линии Jurkat было установлено, что достоверно значимое снижение показателя регистрировалось только в случае присутствия в среде культивирования DTE, а при добавлении в среду инкубации DEX и/или NEM, BSO, KRIBB3 происходило повышение концентрации КПБ относительно значений в интактных опухолевых клетках (таблицы 15, 16, 19). Кроме этого, в опухолевых клетках линии Jurkat при внесении в среду культивирования DTE, DTE и DEX нами было установлено

достоверно значимое снижение концентрации окисленного триптофана и битирозина по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблицы 15, 16, 19). Достоверно значимым снижением содержания окисленного триптофана, относительно значения в интактных опухолевых клетках, также характеризовались опухолевые клетки линии Jurkat культивируемые в присутствии BSO или KRIBB3, BSO и DEX, NEM и DEX (таблицы 15, 16, 19). Повышение содержания КПБ могло быть связано с дисбалансом в работе ферментов антиоксидантной защиты, а именно со снижением активности ГПО, что приводило к повышению уровня гидроксильного радикала. При этом в описанных условиях культивирования в опухолевых клетках линии Jurkat наиболее интенсивно происходила необратимая окислительная модификация протеинов. Белки, которые подверглись карбонилированию, образуют агрегаты и фрагментируются.

Вероятнее всего, действие гидроксильного радикала способствовало активному образованию пероксидов в белковой молекуле, которые затем при участии металлов переменной валентности ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) превращались в алкокси-радикалы. А перераспределение заряда в алкокси-радикалах реализовывалось в образовании КПБ [212]. Карбонильные производные белков могут образовываться в результате металл-катализируемого окисления наиболее чувствительных аминокислотных радикалов – пролина, аргинина, лизина и гистидина [271, 437]. А ароматические аминокислоты реже подвергаются воздействию металлов переменной валентности [440]. Поэтому, зафиксированный нами прирост концентрации гидроксильного радикала косвенно доказывал участие  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$  в карбонилировании протеинов опухолевых клеток линии Jurkat в условиях изменения редокс-статуса и ингибирования Hsp27.

Кроме этого, действие супероксидного анион-радикала и пероксида водорода способствует разрыву полипептидной цепи с образованием амидов и карбонильных производных [16]. Считается, что механизм окисления триптофановых остатков аминокислот сопряжен с генерацией нейтрального

индолного радикала, который может принимать участие в образовании тирозильных фенокси-радикалов за счет транспорта электронов. Это, в свою очередь, является причиной образования белковых сшивок (cross-link) [210].

На прямое участие ингибирования синтеза глутатиона *de novo* в активации карбонилирования протеинов указывало наличие отрицательной корреляционной взаимосвязи между величиной соотношения GSH/GSSG и содержанием КПБ в опухолевых клетках линии Jurkat при внесении в культуральную среду BSO ( $r = -0,83$ ;  $p < 0,05$ ).

При сопоставлении показателей, характеризующих ОМБ с результатами реализации и регуляции программированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat нами были получены положительные корреляционные взаимосвязи между содержанием окисленного триптофана и числом Fas-положительных клеток ( $r = +0,89$ ;  $p < 0,05$ ), концентрацией окисленного триптофана и транскрипционного фактора Araf-1 ( $r = +0,89$ ;  $p < 0,05$ ) в условиях присутствия в среде культивирования DEX; между концентрацией окисленного триптофана и числом TNF RI-положительных клеток ( $r = +0,83$ ;  $p < 0,05$ ) в условиях добавления в среду культивирования DTE. Кроме этого, в опухолевых клетках линии Jurkat нами были установлены отрицательные корреляционные взаимосвязи между концентрацией окисленного триптофана и транскрипционного фактора NF-κB ( $r = -0,83$ ;  $p < 0,05$ ), содержанием КПБ и транскрипционного фактора NF-κB ( $r = -0,89$ ;  $p < 0,05$ ) в условиях присутствия в среде культивирования DTE; между содержанием битирозина и транскрипционного фактора NF-κB ( $r = -0,94$ ;  $p < 0,05$ ) при внесении в среду культивирования KRIBB3.

Одной из причин выживания злокачественных клеток является повышенный уровень экспрессии в них белков теплового шока [39, 231, 442]. Механизмы модуляции апоптоза в опухолевых клетках с помощью белков теплового шока различны. Так, например, шапероны способны препятствовать активации каспаз, связываться непосредственно с цитоплазматической фракцией цитохрома C и транскрипционным фактором Araf-1 и, тем самым, блокировать

образование апоптосомы [102]. Кроме этого, в условиях ОС в опухолевых клетках линии Jurkat неизбежно происходит окислительное повреждение белковых молекул, которые нуждаются в рефолдинге при участии шаперонов.

В ходе проведенного исследования в опухолевых клетках линии Jurkat нами было зарегистрировано достоверно значимое увеличение концентрации Hsp27 при добавлении в среду инкубации DTE либо NEM и DEX, BSO и DEX, KRIBB3 и DEX, а снижение – в присутствии DEX или NEM, или KRIBB3 относительно показателей в интактных опухолевых клетках (таблицы 7, 10, 20). Внесение DEX и/или NEM, DTE, BSO в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat сопровождалось однонаправленным эффектом – достоверно значимым снижением содержания Hsp70 по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках (таблицы 7, 10, 20).

Выполненный корреляционный анализ позволил нам выдвинуть предположение о влиянии редокс-статуса и рефолдинга на ОМБ в опухолевых клетках линии Jurkat посредством установленной тесной положительной взаимосвязи между содержанием белково-связанного глутатиона и концентрацией Hsp27 ( $r = +0,83$ ;  $p < 0,05$ ) в условиях присутствия в среде культивирования NEM. Последний факт указывает на то, что при снижении содержания Hsp27 процесс глутатионирования протеинов протекал менее активно. G. Shuhong и соавторы (2007) показали участие Hsp70 в поддержании функциональной активности компонентов системы глутатиона в эпителиальных клетках почки [214].

Таким образом, в опухолевых клетках линии Jurkat воздействие DTE вызывало не только выраженное протекторное влияние на процессы ОМБ, но и, вероятно, глутатионирование функциональных редокс-чувствительных SH-групп цистеина в ферментах тиолдисульфидной системы и белках-регуляторах апоптоза, способствуя их активации [386]. Изменение редокс-статуса изучаемых клеток при блокировании SH-групп пептидов и белков сопровождалось образованием ковалентных модификаций аминокислот, с последующим

карбонилированием протеинов. Карбонилирование аминокислотных остатков является модификацией на уровне первичной структуры белка, что способствует агрегации и фрагментации белковых молекул [109]. Следствием таких структурных повреждений является, в частности, резкое повышение чувствительности белков к протеолитической деградации протеазами и активация апоптоза опухолевых клеток [43, 44].

Доказательством активации убиквитин-зависимой деградации протеинов в опухолевых клетках линии Jurkat было зафиксированное нами достоверно значимое снижение содержание убиквитина при внесении в среду культивирования индуктора апоптоза и/или редокс-модуляторов, а также ингибитора Hsp27 по сравнению с результатами в интактных опухолевых клетках (таблицы 17, 18, 19). Следует отметить, что содержание убиквитинлигазы при указанных условиях культивирования менялось разнонаправленно. Так, в опухолевых клетках линии Jurkat нами было установлено достоверно значимое снижение содержания убиквитинлигазы в случае присутствия в культуральной среде DTE или BSO, NEM и DEX, DTE и DEX, а увеличение концентрации фермента вызывали DEX или NEM, или KRIBB3 относительно показателей в интактных опухолевых клетках (таблицы 17, 18; 19).

При проведении корреляционного анализа полученных результатов в опухолевых клетках линии Jurkat нами были установлены тесные положительные взаимосвязи между содержанием Hsp27 и концентрацией убиквитина ( $r = +0,83$ ;  $p < 0,05$ ) при внесении в среду культивирования NEM; величиной GSH/GSSG и содержанием убиквитинлигазы ( $r = +0,99$ ;  $p < 0,05$ ) в условиях присутствия в среде культивирования DTE; величиной GSH/GSSG и содержанием убиквитина ( $r = +0,83$ ;  $p < 0,05$ ) в условиях добавления в среду культивирования BSO. Кроме этого, в опухолевых клетках линии Jurkat нами были выявлены тесные отрицательные взаимосвязи между активностью каспазы-3 и концентрацией убиквитина ( $r = -0,94$ ;  $p < 0,05$ ) при внесении в среду культивирования NEM.

Однонаправленное снижение содержания Hsp70, убиквитина и убиквитинлигазы в опухолевых клетках линии Jurkat при действии протектора SH-групп пептидов и протеинов было отражено в виде тесной положительной взаимосвязи между концентрацией Hsp70 и убиквитина ( $r = +0,83$ ;  $p < 0,05$ ).

Таким образом, в ходе проведенного исследования нами была установлена роль тиолдисульфидной системы в регуляции программированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat, а именно, доказана взаимосвязь увеличения презентации TNF RI и Fas-рецепторов, изменения содержания проапоптотического (Araf-1) и антиапоптотического (NF-κB) факторов транскрипции, активности каспазы-3 и количества аннексин-положительных опухолевых клеток в условиях внутриклеточного редокс-модулирования при участии GSH.

В целом, полученные нами результаты представляют собой теоретическую основу для последующей разработки методов селективной коррекции дизрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии, связанной с формированием ОС.

## Заключение

Одним из звеньев патогенеза опухолевого роста является дизрегуляция программированной гибели клеток на фоне формирования ОС [44, 108, 197]. В настоящее время АФК рассматривают как с позиции повреждения биополимеров клетки, так и в качестве компонентов внутриклеточной сигнальной системы [19, 309, 394]. Исследования последних лет связаны с выяснением роли компонентов тиолдисульфидной системы в регуляции экспрессии генов, активности ферментов и факторов транскрипции, внутриклеточной сигнализации апоптоза и других процессов [28, 60, 165, 222, 281, 420, 473]. Однако до сих пор молекулярные механизмы дизрегуляции апоптоза при патологических состояниях, сопровождающихся формированием ОС, в том числе опухолевой прогрессии, до конца не изучены, что и определило актуальность представленного исследования.

Дизрегуляция летальной программы клеток обусловливается изменением соотношения про- и антиапоптогенных белков, возникающим, в частности, в результате последовательной активации редокс-зависимых элементов сигнальной трансдукции различными факторами как внутри-, так и внеклеточного происхождения [37, 108, 373]. Именно межбелковые взаимодействия играют важную роль в сборке и функционировании ферментных комплексов, осуществляющих внутриклеточный метаболизм. В основе функционирования регуляторных, эффекторных, структурных и транспортных молекул полипептидной природы при действии эндогенных и экзогенных лигандов может лежать изменение их конформации, что приводит к дизрегуляции внутриклеточных процессов, в том числе апоптоза. Белковые молекулы представляют собой мишени для регуляции, как внутриклеточной трансдукции сигнала, так и направленности метаболических путей. Причем, белки занимают одну из ведущих позиций в регуляторном процессе, так как, в силу особенностей своего строения, могут располагаться в любом компартменте клетки [16, 77].

Нами было показано увеличение концентрации АФК на фоне изменения состояния тиолдисульфидной системы, что сопровождалось возрастанием числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, приводящим к развитию гипоэнергетического состояния в опухолевых клетках линии Jurkat. Также нами было установлено, что в опухолевых клетках линии Jurkat в условиях ОС большую часть восстановительного потенциала тиолдисульфидная система использовала для защиты белковых молекул от необратимого окисления, в том числе путем глутатионилирования, что приводило к ингибированию апоптоза опухолевых клеток. Тиоловые группы цистеин-содержащих доменов представляют собой сайт-специфичные последовательности полипептидов для реализации тиоляции/детиоляции с участием глутатиона. Чрезмерная наработка АФК приводила к окислительной модификации рецепторных, структурных, транспортных, каталитических белков, что способствовало накоплению КПБ, окисленного триптофана и битирозина в опухолевых клетках линии Jurkat. Однако избыточное количество окислительно-модифицированных белков в лимфоцитах крови в условиях экспериментального ОС сопровождалось активацией программированной клеточной гибели на фоне дисбаланса тиолдисульфидной системы (увеличение концентрации GSH, GSSG, активности ГПО и TRP, снижение содержания SH-групп протеинов) (рисунок 24). Но, при установленной нами активации ОМБ в опухолевых клетках линии Jurkat этого эффекта не зафиксировано (рисунок 25). Разнонаправленные изменения реализации программированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat (ингибирование апоптоза) и лимфоцитов крови в условиях экспериментального ОС (активация апоптоза) требовали выявления редокс-зависимых молекулярных механизмов дизрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии.

Эффективным способом поддержания адекватной функциональной способности белков является рефолдинг при помощи шаперонов. В проведенном исследовании нами была установлена гиперпродукция как Hsp27 и Hsp70, так и

убиквитина в опухолевых клетках линии Jurkat, что косвенно указывало, с одной стороны, на активное восстановление конформации протеинов, а, с другой – на несостоятельность этого процесса и активацию протеолитической деградации модифицированных молекул. Установленный факт, вероятнее всего, является одним из механизмов ингибирования апоптоза.

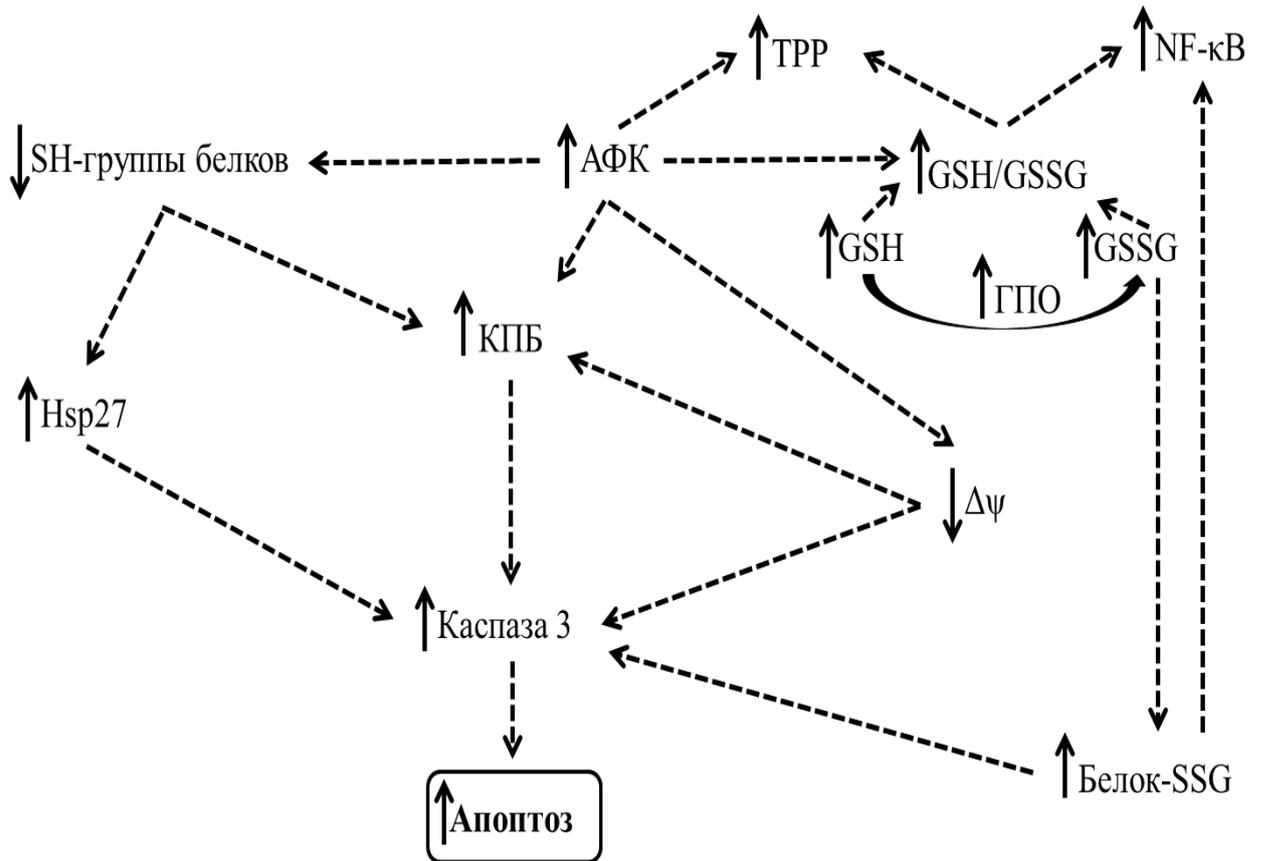


Рисунок 24 – Причинно-следственные связи регуляции апоптоза в лимфоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* (по результатам собственных исследований)

Примечание – АФК – активные формы кислорода, TPP – тиоредоксинредуктаза, ГПО – глутатионпероксидаза, КПБ – карбонильные производные белков, белок-SSG – белково-связанный глутатион, GSH – восстановленный глутатион, GSSG – окисленный глутатион,  $\Delta\psi$  – трансмембранный митохондриальный потенциал, NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – транскрипционный ядерный фактор  $\kappa$ B, Hsp (heat shock protein) – белок теплового шока

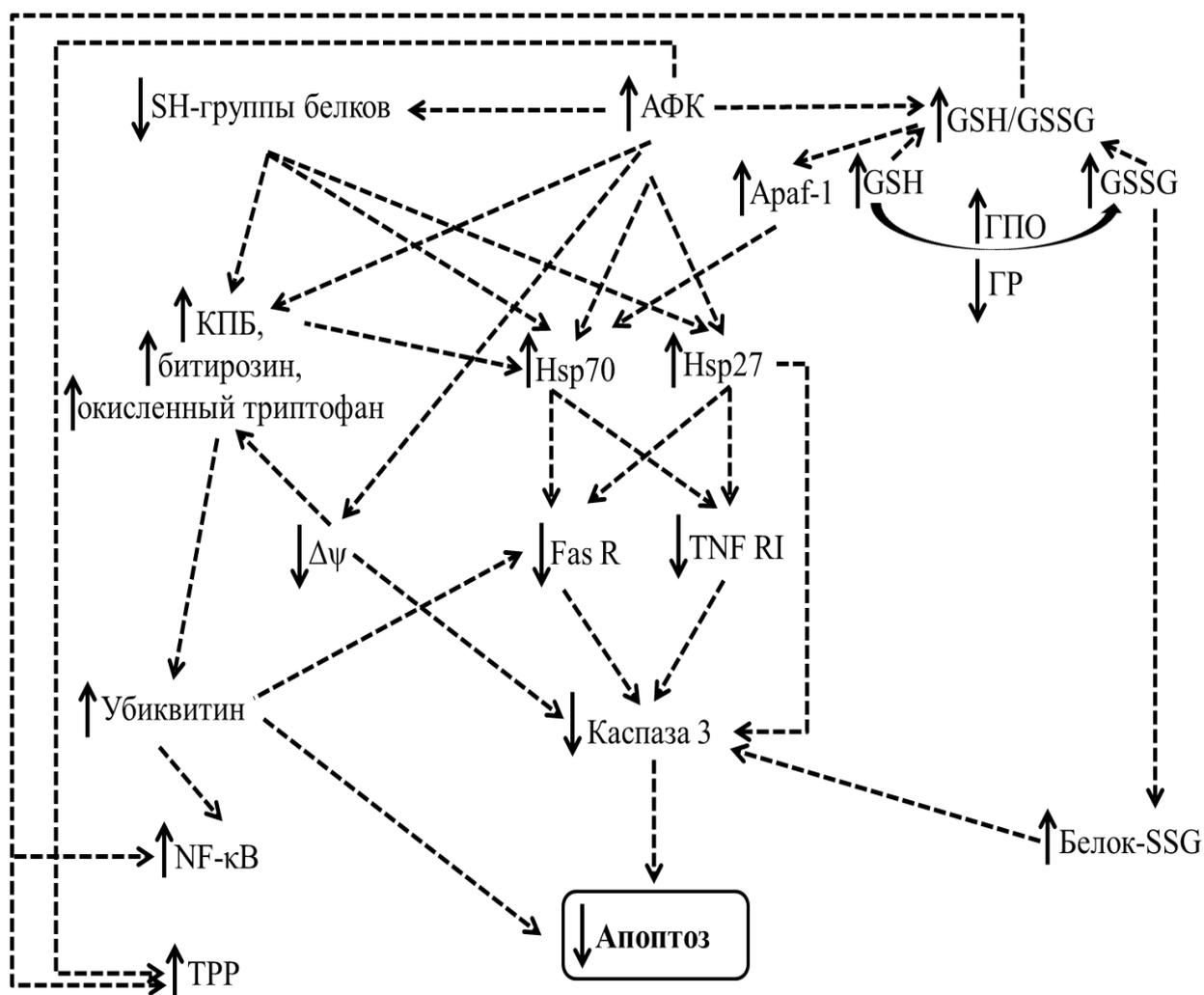


Рисунок 25 – Причинно-следственные связи регуляции апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat (по результатам собственных исследований)

Примечание – АФК – активные формы кислорода, TRP – тиоредоксинредуктаза, ГР – глутатионредуктаза, ГПО – глутатионпероксидаза, КПБ – карбонильные производные белков, белок-SSG – белково-связанный глутатион, GSH – восстановленный глутатион, GSSG – окисленный глутатион,  $\Delta\psi$  – трансмембранный митохондриальный потенциал, TNF RI и Fas R – рецепторы семейства фактора некроза опухоли, Араф-1 (apoptotic protease activating factor 1) – фактор активации протеаз-1, NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – транскрипционный ядерный фактор  $\kappa$ B, Hsp (heat shock protein) – белок теплового шока

Белки теплового шока 27, 70 и убиквитин вносят существенный вклад не только в регулирование редокс-баланса, но и являются факторами «ускользания» опухолевых клеток линии Jurkat от запрограммированной клеточной гибели,

способствуя поддержанию их жизнедеятельности и оптимальному функционированию в условиях ОС. Кроме этого, Hsp тесно ассоциированы с фазами клеточного цикла. Известно, что Hsp70 индуцируется при переходе клетки из фазы G<sub>1</sub> в S-фазу клеточного цикла [462].

В опухолевой клетке активация протеолиза позволяла элиминировать поврежденные молекулы белков путем расщепления их до аминокислот, которые затем вновь могли использоваться клеткой в процессах биосинтеза полипептидов. Одним из механизмов удаления поврежденных белков является убиквитин-зависимая деградация протеинов. Помимо этого, присоединение убиквитина к белку в некоторых случаях клеткой воспринимается как часть механизма сигнальной трансдукции и обеспечивает изменение конформации протеина или его внутриклеточную локализацию.

В проведенном исследовании при помощи ингибиторного анализа нами была выявлена роль компонентов тиолдисульфидной системы в редокс-регуляции экспрессии TNF RI и Fas-рецепторов, изменения содержания факторов транскрипции Araf-1 и NF-κB, активности каспазы-3 и количества аннексин-положительных опухолевых клеток линии Jurkat, что указывает на включение SH-групп протеинов и пептидов (глутатиона, тиоредоксина) в процесс сигнальной трансдукции клеток и их влияние на реализацию апоптоза. Смещение редокс-статуса опухолевых клеток линии Jurkat в сторону восстановленности вызывало активацию апоптоза, что достигалось преимущественно путем вовлечения сульфгидрильных групп протеинов в процесс глутатионилирования белков-регуляторов и белков-эффекторов программированной гибели, а при смещении редокс-статуса в сторону окисления – путем накопления необратимых карбонильных производных протеинов, которые являлись триггерными молекулами для запуска их протеолитической деградации.

Таким образом, в процессе выполнения работы нами были установлены молекулярные механизмы участия тиолдисульфидной системы, окислительно-модифицированных протеинов и убиквитин-зависимой деградации белков в дизрегуляции программированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat и выявлены потенциальные мишени селективного редокс-управления апоптозом при опухолевой прогрессии (рисунок 26). Поскольку белки в своей совокупности не только определяют функциональные возможности отдельной клетки, но и представляют собой молекулярные мишени для фармакологической коррекции, селективное управление глутатионилированием или убиквитинилированием белков-регуляторов и белков-эффекторов апоптоза представляется весьма перспективным для разработки персонализированных подходов к терапии злокачественных опухолей.

Полученные нами данные указывают на то, что молекулярными мишенями для таргетного воздействия на программированную гибель опухолевых клеток линии Jurkat могут выступать компоненты тиолдисульфидной системы (GSH, GSSG, ГР, ТРР), регуляция ОМБ и их убиквитин-зависимой деградации (таблицы 19, 20). Результаты проведенного исследования могут стать основой для разработки технологии управления апоптозом при опухолевой прогрессии.

Поиск подходов к коррекции дизрегуляции апоптоза и индуцированных ОС нарушений функций клеток открывает широкие перспективы для молекулярных технологий в медицинской практике. Это позволит повысить эффективность существующих методов патогенетической терапии большого числа социально-значимых заболеваний, сопровождающихся дизрегуляцией апоптоза на фоне развития ОС. В связи с этим, управление процессами глутатионилирования и убиквитинилирования протеинов можно рассматривать как потенциальную молекулярную мишень устранения дизрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии.

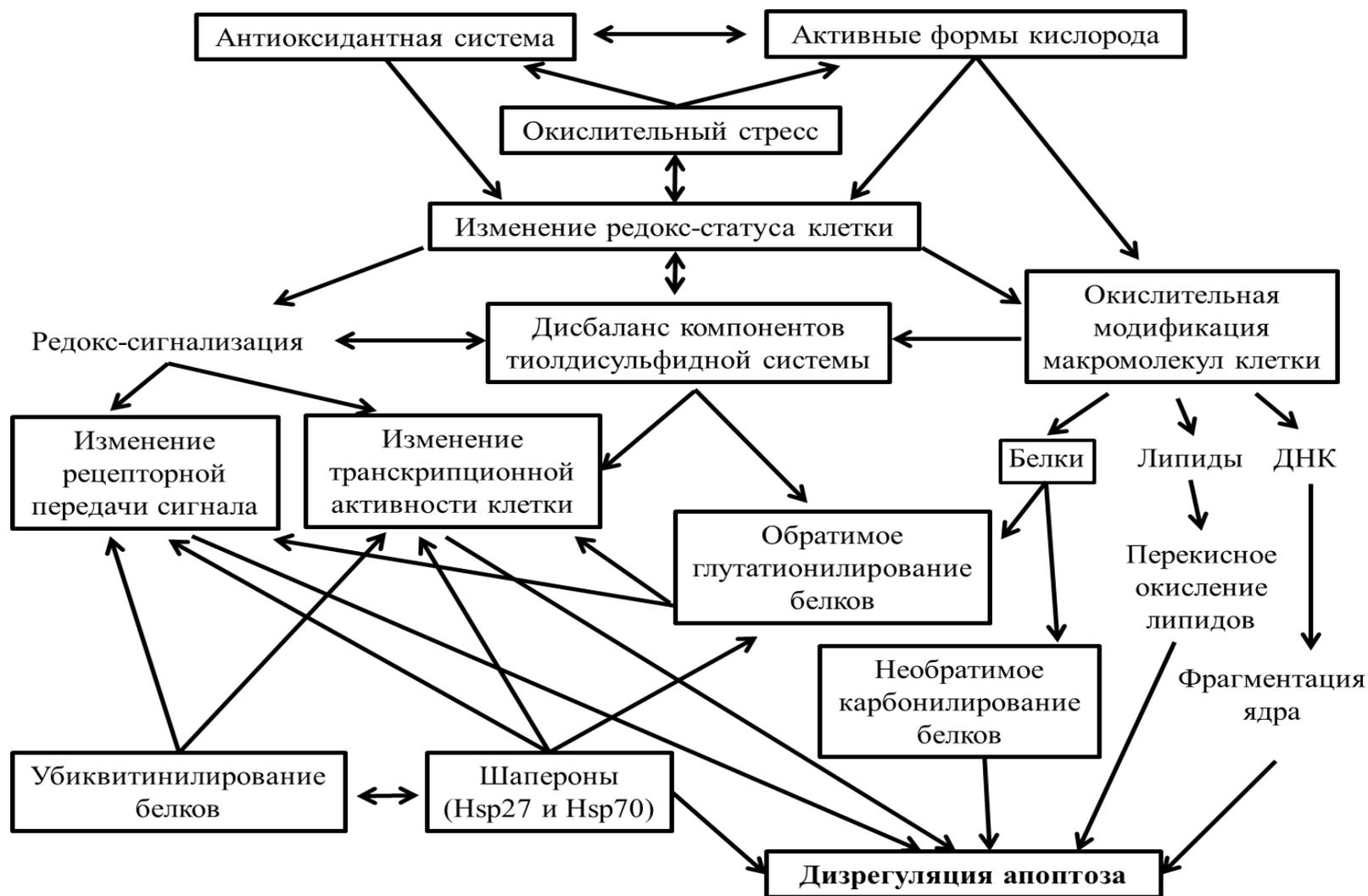


Рисунок 26 – Молекулярные механизмы участия компонентов тиолдисульфидной системы, окислительной модификации белков и убиквитин-зависимой деградации протеинов в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat (по данным [15, 44, 357] и результатам собственных исследований – выделено в рамки)

## Выводы

1. Редокс-зависимая дизрегуляция апоптоза в интактных опухолевых клетках линии Jurkat сопряжена с дисбалансом тиолдисульфидной системы, активацией обратимой (увеличение содержания белково-связанного глутатиона) и необратимой (увеличение концентрации карбонильных производных протеинов, битирозина, окисленного триптофана) окислительной модификации белков, убиквитин-зависимого пути деградации протеинов и возрастанием концентрации белков теплового шока 27 и 70.

2. В условиях экспериментального окислительного стресса (0,5 мМ  $H_2O_2$ ) активация запрограммированной гибели лимфоцитов крови опосредована изменением редокс-статуса тиолдисульфидной системы, возрастанием уровня окислительной модификации белков (увеличение содержания белково-связанного глутатиона и карбонильных производных протеинов) и содержания белка теплового шока 27.

3. Активация рецепторного пути апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat в условиях внутриклеточного редокс-модулирования сопряжена: при блокировании SH-групп пептидов и белков (N-этилмалеимид) с возрастанием уровня карбонильных производных протеинов; при ингибировании синтеза глутатиона *de novo* (бутионин-сульфоксимин) – с увеличением содержания карбонильных производных протеинов и снижением концентрации белково-связанного глутатиона; при восстановлении SH-групп пептидов и белков (1,4-дитиоэритритол) – со снижением концентрации карбонильных производных протеинов.

4. Проапоптотический эффект (активация рецепторного и митохондриального путей) внутриклеточного редокс-модулирования (N-этилмалеимид, бутионин-сульфоксимин, 1,4-дитиоэритритол) в опухолевых клетках линии Jurkat опосредован участием компонентов тиолдисульфидной системы (восстановленный, окисленный и белково-связанный глутатион) в регуляции уровня окислительно-модифицированных протеинов.

5. Активация рецепторного и митохондриального путей апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat при изменении редокс-статуса (N-этилмалеимид, бутионин-сульфоксимин, 1,4-дитиоэритритол) сопряжена со снижением содержания убиквитина.

6. Проапоптотический эффект ингибитора белка теплового шока 27 (5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол) преимущественно реализовывался за счет активации рецепторного пути апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat. Индукция запрограммированной гибели опухолевых клеток опосредована снижением редокс-статуса тиолдисульфидной системы (увеличение содержания окисленного глутатиона, снижение активности тиоредоксинредуктазы), активацией окислительной модификации белков (увеличение концентрации карбонильных производных протеинов и снижение содержания белково-связанного глутатиона) и убиквитин-зависимой деградации (увеличение содержания убиквитина и снижение концентрации убиквитинлигазы).

7. Возрастание уровня карбонильных производных протеинов, уменьшение концентрации белково-связанного глутатиона и убиквитина в опухолевых клетках линии Jurkat связано со снижением содержания белков теплового шока 27, 70.

8. Молекулярными механизмами активации рецепторного и митохондриального путей апоптоза в условиях модуляции редокс-статуса в опухолевых клетках линии Jurkat являются глутатионилирование и убиквитинилирование белков при участии компонентов тиолдисульфидной системы и белков теплового шока 27, 70.

**Список использованных сокращений**

- АФК – активные формы кислорода,  
белок-(SH)<sub>2</sub> – белок восстановленный,  
белок-S<sub>2</sub> – белок окисленный,  
белок-SH – SH-группы белков,  
белок-SSG – белково-связанный глутатион,  
ГПО – глутатионпероксидаза,  
ГР – глутатионредуктаза,  
ДНФГ – динитрофенилгидразин,  
ДТНБ – 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойная) кислота,  
Е1 – убиквитин-активирующий фермент,  
Е2 – убиквитин-конъюгирующий фермент,  
Е3 – убиквитинлигаза,  
ИФА – иммуноферментный анализ,  
кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота,  
КПБ – карбонильные производные белков,  
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота,  
НАДФН – никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный,  
ОМБ – окислительная модификация белков,  
ОС – окислительный стресс,  
ПЦР – полимеразная цепная реакция,  
СОД – супероксиддисмутаза,  
субстрат-(SH)<sub>2</sub> – субстрат восстановленный,  
субстрат-S<sub>2</sub> – субстрат окисленный,  
ТРР – тиоредоксинредуктаза,  
ТХУ – трихлоруксусная кислота,  
у.е. – условные единицы,  
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат,  
Ac-DEVD-AMC – N-ацетил-(Асп-Глу-Вал-Асп)-7-амино-4-метилкумарин,

- AIF – apoptosis inducing factor; апоптоз-индуцирующий фактор,
- Araf-1 – apoptotic protease activating factor-1, фактор активации протеаз-1,
- APC – аллофиикоцианин,
- ARE – antioxidant responsive element, антиоксидант-респонсивный элемент,
- ASK – apoptosis signal-regulating kinase, апоптоз сигнал-регуляторная киназа,
- A-SMase – acidic sphingomyelinase-activated domain, кислый сфингомиелин-активирующий домен,
- AP-1 – activating protein-1 transcription factor, активатор транскрипционного фактора-1,
- Bcl-2 – белки-регуляторы апоптоза В-клеток лейкемии-2,
- BSO – бутионин-сульфоксимин,
- CARD – caspase activation and recruitment domain, домен активации и рекрутирования каспаз в клетках,
- CD – cluster of differentiation, поверхностный кластер дифференцировки,
- c-FLIP – cellular FADD-like interleukin-1 $\beta$  converting enzyme inhibitory protein, клеточный ингибитор протеинов,
- CHIP – carboxyl terminus of heat shock proteins 70-interacting protein, комплекс интеграции белка теплового шока 70 и поврежденного белка
- cIAP 1/2 – cellular inhibitor of apoptosis proteins 1/2, клеточный ингибитор апоптоз-специфических протеаз 1/2,
- Ct – пороговый цикл,
- DD – death domain, домен смерти,
- DED – death-effector domain, домен эффектора смерти,
- DEX – дексаметазон,
- DIABLO – direct inhibitor of apoptosis proteins binding protein with low pI, белок с низким pI, прямо связывающий ингибитор апоптоз-специфических протеаз,

DISC – death-inducing signaling complex, смерть-индуцирующий сигнальный комплекс,

dNTP – дезоксирибонуклеотидтрифосфаты,

DR – death receptor, смерть-передающий рецептор,

DTE – 1,4-дитиоэритритол,

EGF – epidermal growth factor; эпидермальный фактор роста,

ERK 3 – extracellular signal-regulated kinase 3, внеклеточная сигнальная киназа 3,

FADD – Fas-associated DD-protein, адаптер Fas-ассоциированного домена смерти,

FITC – флюоресцеин изотиоционат,

FSC – forward scatter, малое угловое светорассеивание,

Grx-(SH)<sub>2</sub> – глутаредоксин восстановленный,

Grx-S<sub>2</sub> – глутаредоксин окисленный,

GSH – восстановленный глутатион,

GSSG – окисленный глутатион,

Hdj – кошаперон белка теплового шока 40,

HepG<sub>2</sub> – гепатокарцинома человека,

HIF-1 $\alpha$  – hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , гипоксия-индуцибельный фактор 1 $\alpha$ ,

Hsp – heat shock proteins, белки теплового шока,

HtrA2 – митохондриальная АТФ-зависимая сериновая протеаза 2,

IAP – inhibitor of apoptosis proteins, ингибитор апоптоз-специфических протеаз,

ИКК – I-кВ kinase, комплекс ингибиторных киназ,

I-кВ – inhibitor кВ $\alpha$ , ингибиторный белок кВ $\alpha$ ,

IC-1 – 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин йодид,

JNK – c-Jun N-terminal kinase, c-Jun N-терминальная киназа,

JNKK – c-Jun N-terminal kinase kinase, киназа c-Jun N-терминальной киназы,

Jurkat – опухолевые клетки «Т-лимфобластной лейкемии человека»,

KRIBB3 – 5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол,

MAP – mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа,

МКК – mitogen-activated protein kinase kinases, митоген-активируемая протеинкиназа киназы,

МЕКК1 – mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase 1, митоген-активируемая внеклеточная сигнальная протеинкиназа 1,

NEM – N-этилмалеимид,

NEMO – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells essential modulator, модулятор транскрипционного ядерного фактора κВ,

NF-κВ – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, транскрипционный ядерный фактор κВ,

НИК – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells inducing kinase, индуцирующая киназа транскрипционного ядерного фактора κВ,

Nrf2 – nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, ядерный фактор эритроидных производных 2,

N-SMase – neutral sphingomyelinase-activated domain, нейтральный сфингомиелин-активирующий домен,

PBS – фосфатно-солевой буфер,

P-His – гистидин,

PI – пропидия йодид,

PNH<sub>2</sub> – аминогруппы белков,

P-NH<sub>2</sub> – лизин,

PSH – цистеин,

PE – фикоэритрин,

- Ref-1 – редокс-фактор 1,
- RIP – receptor interacting proteins, адаптерный белок,
- sHsp – small heat shock proteins, малые белки теплового шока,
- SIP – стандартный изоосмотический раствор Перколла,
- Smac – second mitochondria derived activator of caspases, вторичный митохондриальный активатор каспаз,
- SSC – side scatter, боковое светорассеивание,
- TGF  $\beta$ 1 – transforming growth factor  $\beta$ 1, трансформирующий фактор роста  $\beta$ 1,
- Tm – температура плавления праймеров,
- TNF – tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли,
- TNF RI – tumor necrosis factor receptor I type, рецептор фактора некроза опухоли I типа,
- TRADD – tumor necrosis factor receptor I-associated death domain, адаптерный белок, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли I,
- TRAF 2 – tumor necrosis factor-receptor-associated factors 2, фактор 2, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли,
- TRAIL – tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, фактор некроза опухоли-зависимый апоптоз-индуцирующий лиганд,
- Trx-(SH)<sub>2</sub> – тиоредоксин восстановленный,
- TrxR – НАДФН-зависимая тиоредоксинредуктаза,
- Trx-S<sub>2</sub> – тиоредоксин окисленный,
- XIAP – x-inhibitor of apoptosis proteins, x-ингибитор апоптоз-специфических протеаз,
- $\Delta pH$  – концентрационный градиент протонов,
- $\Delta \mu H^+$  – электрохимический потенциал,
- $\Delta \psi$  – трансмембранный митохондриальный потенциал.

### Список литературы

1. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / В.И. Донцов, В.Н. Крутько, Б.М. Мрикаев, С.В. Уханов // Труды ИСА РАН. – 2006. – Т. 19. – С. 50-69.
2. Аруин, М. Апоптоз при патологических процессах в органах пищеварения / М. Аруин // Клиническая медицина. – 2000. - № 1. – С. 5-10.
3. Белушкина, Н.Н. Молекулярные основы патологии апоптоза / Н.Н. Белушкина, С.Е. Северин // Архив патологии. – 2001. – № 1. – С. 51-59.
4. Бершова, Т.В. Патогенетическое значение апоптоза кардиомиоцитов при сердечной недостаточности / Т.В. Бершова, С.В. Монаенкова, А.Г. Гасанов // Педиатрия. – 2009. – Т. 88, № 5. – С. 147-154.
5. Бессонова, Л.О. Роль системы глутатиона в антиоксидантной защите при сочетанной патологии гипоксического генеза / Л.О. Бессонова, Н.В. Верлан, Л.С. Колесниченко // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 6. – С. 19-21.
6. Биохимия человека : в 2 т. : пер. с англ. / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейс, В. Родуэлл. – М. : Мир, 2009. – Т. 2. – 800 с.
7. Бышнева, Л.Н. Влияние УФ-излучения на содержание аскорбиновой кислоты, SH-групп и активность глутатионредуктазы в хрусталике глаза / Л.Н. Бышнева, В.В. Сенчук // Вопросы медицинской химии. – 2002. – Т. 48, № 5. – С. 455-460.
8. Веденов, А.А. Моделирование элементов мышления / А.А. Веденов. – М. : Наука, 1988. – 108 с.
9. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 13-19.
10. Влияние окисленного глутатиона и его фармакологического аналога препарата глутоксим на внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  в макрофагах / Л.С. Курилова, З.И. Крутецкая, О.Е. Лебедев, В.Г. Антонов // Цитология. 2008. –

Т. 50, № 5. – С. 452-461.

11. Гланц, С. Медико-биологическая статистика : пер. с англ. / С. Гланц. – М. : Практика, 1999. – 459 с.

12. Гордеева, А.В. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция / А.В. Гордеева, Ю.А. Лабас, Р.А. Звягильская // Биохимия. – 2004. – Т. 69, вып. 10. – С. 1301-1313.

13. Дас, Д.К. Превращение сигнала гибели в сигнал выживания при редокс-сигнализации / Д.К. Дас, Н. Молик // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 1. – С. 16-24.

14. Действие ингибиторов белков теплового шока 90 и 27 на дексаметазон-индуцированный апоптоз опухолевых клеток / Е.В. Кайгородова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий и др. // Бюллетень сибирской медицины – 2010. – № 3. – С.68-71.

15. Дубинина, Е.Е. 4-Гидрокси-транс-2-ноненаль в функциональной активности клеток / Е.Е. Дубинина, В.А. Дадали // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 9. – Р. 1189-1211.

16. Дубинина, Е.Е. Окислительная модификация протеинов ее роль при патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // Украинский биохимический журнал. – 2008. – Т. 80, № 6. – С. 5-18.

17. Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты / Е.Е. Дубинина. – СПб. : Медицинская пресса, 2006. – 400 с.

18. Зенков, Н.К. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньшикова // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, вып. 3. – С. 286-296.

19. Зенков, Н.К. Некоторые принципы и механизмы редокс-регуляции / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньшикова, В.О. Ткачев // Кислород и антиоксиданты. – 2009. – Вып. 1. – С. 3-64.

20. Зенков, Н.К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. – М. : МАИК Наука / Интерпериодика, 2001. – 343 с.
21. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М. : ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2015. – 250 с.
22. Иванов, А.С. Основные принципы конформационного разнообразия белков для медико-биологов / А.С. Иванов // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57, вып. 1. – С. 31-60.
23. Кайгородова, Е.В. Апоптоз и белки теплового шока / Е.В. Кайгородова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий. – Томск : Печатная мануфактура, 2012. – 180 с.
24. Калинина, Е.В. Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах / Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, А.Н. Саприн // Успехи биологической химии. – 2008. – Т. 48. – С. 319-358.
25. Коваленко, Е.И. Влияние пероксида водорода на способность нейтрофилов генерировать активные формы кислорода и хлора и секретировать миелопероксидазу *in vitro* / Е.И. Коваленко, Г.Н. Семенкова, С.Н. Черенкевич // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 10. – С. 837-847.
26. Колегова, Е.С. Малые белки теплового шока и убиквитин-протеасомная система при злокачественных опухолях / Е.С. Колегова, И.В. Кондакова, А.А. Завьялов // Вопросы онкологии. – 2016. – № 3. – С. 401-405.
27. Кулинский, В.И. Биологическая роль глутатиона / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современной биологии. – 1990. – Т. 110, вып. 1. – С. 20-23.
28. Кулинский, В.И. Глутатион ядра клетки и его функции / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, № 6. – С. 657-662.

29. Курганов, Б.И. Оценка активности молекулярных шаперонов в тест-системах, основанных на подавлении агрегации белков / Б.И. Курганов // Успехи биологической химии. – 2002. – Т. 42. – С. 89-138.
30. Луцак, В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий / В.И. Луцак // Биохимия. – 2001. – Т. 66, вып. 5. – С. 592-609.
31. Луцак, В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма / В.И. Луцак // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 8. – С. 995-1015.
32. Манских, В.Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение / В.Н. Манских // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 11. – С. 909-915.
33. Маргулис, Б.А. Белки стресса в эукариотической клетке / Б.А. Маргулис, И.В. Гужова // Цитология. – 2000. – Т. 42, № 4. – С. 323-342.
34. Маргулис, Б.А. Двойная роль шаперонов в ответе клетки и всего организма на стресс / Б.А. Маргулис, И.В. Гужова // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 3. – С. 219-228.
35. Мартинович, Г.Г. Редокс-гомеостаз клеток / Г.Г. Мартинович, С.Н. Черенкевич // Успехи физиологических наук. – 2008. – Т. 39, № 3. – С. 29-44.
36. Медицинские лабораторные технологии : в 2 т. / под ред. А.И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 1998. – Т. 2. – 656 с.
37. Митогенактивированные протеинкиназы JNK и p38 являются редокс-зависимыми молекулярными мишенями нарушения апоптоза при окислительном стрессе / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Е.В. Кайгородова и др. // Успехи физиологических наук. – 2009. – Т. 40, № 2. – С. 3-11.
38. Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция цереброкурином / И.Ф. Беленичев, Ю.М. Колесник, С.В. Павлов и др. // Международный неврологический журнал. – 2008. – № 4 (20). – С. 20-26.
39. Модулирующие апоптоз эффекты белков теплового шока: влияние шаперона Hsp27 на белки семейства Bcl-2 в опухолевых клетках линии Jurkat / Н.В. Рязанцева, Е.В. Кайгородова, А.Н. Марошкина и др. // Вопросы онкологии. –

2012. – Т. 58. № 4. – С. 541-544.

40. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера : в 3 т. : пер. с англ. / Д. Нельсон, М. Кокс. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2014. – Т. 2. – 640 с.

41. Образование метаболитов оксида азота при росте перевиваемых опухолей с разным метастатическим потенциалом / В.П. Дерягина, Н.И. Рыжова, Л.В. Кривошеева, И.С. Голубева // Биомедицинская химия. – 2014. – Т. 60, № 6. – С. 661-667.

42. Окисленный глутатион вызывает активацию рецептора эпидермального фактора роста и Мар-киназ ERK 1,2 / К.П. Василенко, Е.Б. Бурова, В.Г. Антонов, Н.Н. Никольский // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 500-507.

43. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Ключев и др. // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 1. – С. 74-78.

44. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин и др. – Новосибирск : АРТА, 2008. – 284 с.

45. Окислительный стресс в модуляции апоптоза нейтрофилов в патогенезе острых воспалительных заболеваний / Н.В. Рязанцева, Т.В. Жаворонок, Е.А. Степовая и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30, № 5. – С. 58-63.

46. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков и др. – М. : Фирма «Слово», 2006. – 556 с.

47. Октябрьский, О.Н. Редокс-регуляция клеточных функций / О.Н. Октябрьский, Г.В. Смирнова // Биохимия. – 2007. – Т. 72, вып. 2. – С. 158-174.

48. Оценка устойчивости к оксидативному стрессу плазмы крови по уровню окисляемости белков и липидов при металлкаatalизируемом окислении /

Э.М. Бекман, О.А. Баранова, Е.В. Губарева и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 142, № 9. – С. 268-272.

49. Пальцев, М.А. Введение в молекулярную медицину / М.А. Пальцев. – М. : Медицина, 2004. – 496 с.

50. Пекарева, Е.В. Роль апоптоза в патогенезе сахарного диабета 1 типа / Е.В. Пекарева, Т.В. Никонова, О.М. Смирнова // Сахарный диабет. – 2010. – № 1. – С. 45-49.

51. Разнонаправленные эффекты  $H_2O_2$  на макрофаги и фибробласты в условиях моделирования окислительного стресса / С.А. Архипов, В.А. Шкурупий, М.В. Зайковская и др. // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 8. – С. 76-77.

52. Рациональная нейропротекция / И.Ф. Беленичев, В.И. Черний, Ю.М. Колесник и др. – Донецк : Издатель Заславский А.Ю., 2009. – 262 с.

53. Роль протеолитических ферментов в контроле различных стадий апоптоза / Г.А. Яровая, Е.А. Нешкова, Е.А. Мартынова, Т.Б. Блохина // Лабораторная медицина. – 2011. – № 11. – С. 39-52.

54. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Н.Ю. Часовских и др. // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 4. – С. 329-334.

55. Сорокин, А.В. Протеасомная система деградации и процессинга белков / А.В. Сорокин, Е.Р. Ким, Л.П. Овчинников // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 3-76.

56. Старкова, Н.Н. Внутриклеточный протеолиз. Сигналы селективной деградации белков / Н.Н. Старкова, Е.П. Королева, Т.В. Ротанова // Биоорганическая химия. – 2000. – Т. 26, № 2. – С. 83-96.

57. Структурно-функциональные модификации лимфоцитарных клеток человека в условиях воздействия активных форм кислорода / В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина, Л.И. Попова, М.С. Трубицына // Вестник ВГУ. Серия : Химия. Биология. Фармация. – 2005. – № 2. – С. 110-115.

58. Тодоров, И.Н. Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологий, процессе старения и апоптозе / И.Н. Тодоров // Российский химический журнал. – 2007. – Том LI, № 1. – С. 93-107.
59. Трансактивация рецептора эпидермального фактора роста окисленным глутатионом и его фармакологическим аналогом Глутоксимом® в клетках A431 / Е.Б. Бурова, К.П. Василенко, В.Г. Антонов, Н.Н. Никольский // Доклады РАН. – 2005. – Т. 404. – С. 1-3.
60. Участие тиолдисульфидной системы в регуляции окислительной модификации белков в нейтрофилах при окислительном стрессе / Е.А. Степовая, Т.В. Жаворонок, Г.В. Петина и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30, № 5. – С 64-69.
61. Фильченков, А.А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций / А.А. Фильченков // Биохимия. – 2003. – Т. 68, вып. 4. – С. 453-466.
62. Цимоха, А.С. Протеасомы: участие в клеточных процессах / А.С. Цимоха // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 4. – С. 277-300.
63. Чеснокова, Н.П. Источники образования свободных радикалов и их значение в биологических системах в условиях нормы / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – № 6. – С. 28-34.
64. Широкова, А.В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки / А.В. Широкова // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 5. – С. 385-394.
65. Эмануэль, Н.М. Физико-химия рака / Н.М. Эмануэль // Природа. – 1982. – № 1. – С. 76-83.
66. Ярилин, А.А. Апоптоз. Природа феномена. Его роль в целостном организме / А.А. Ярилин // Патологическая и экспериментальная терапия. – 1998. – № 2. – С. 43-48.

67. A Bax/Bak-independent mechanism of cytochrome c release / T. Mizuta, S. Shimizu, Y. Matsuoka et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282 (22). – P. 16623-16630.
68. A critical role of redox state in determining HL-60 cell granulocytic differentiation and apoptosis via involvement of PKC and NF-kappaB / J. Savickiene, G. Treigyte, A. Gineitis, R. Navakauskiene // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* – 2010. – Vol. 46 (6). – P. 547-559.
69. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress / N. Chaudhari, P. Talwar, A. Parimisetty et al. // *Front. Cell. Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – P. 213.
70. A novel mechanism of crosstalk between the p53 and NFκB pathways: MDM2 binds and inhibits p65RelA / K. Heyne, C. Winter, F. Gerten et al. // *Cell Cycle.* – 2013. – Vol. 12 (15). – P. 2479-2492.
71. Activation of auxin signalling counteracts photorespiratory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent cell death / P. Kerchev, P. Muhlenbock, J. Denecker et al. // *Plant Cell Environ.* – 2015. – Vol. 38 (2). – P. 253-265.
72. Activity and distribution of intracellular carbonic anhydrase II and their effects on the transport activity of anion exchanger AE1/SLC4A1 / S. Al-Samir, S. Papadopoulos, R.J. Scheibe et al. // *J. Physiol.* – 2013. – Vol. 591 (20). – P. 4963-4982.
73. Adaptive redox response of mesenchymal stromal cells to stimulation with lipopolysaccharide inflammagen: mechanisms of remodeling of tissue barriers in sepsis / N.V. Gorbunov, B.R. Garrison, D.P. McDaniel et al. // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 186795.
74. Adimora, N.J. A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses / N.J. Adimora, D.P. Jones, M.L. Kemp // *Antioxid. Redox Signal.* – 2010. – Vol. 13 (6). – P. 731-743.
75. Afanas'ev, I.B. Signaling functions of free radicals superoxide & nitric oxide under physiological & pathological conditions / I.B. Afanas'ev // *Mol. Biotechnol.*

– 2007. – Vol. 37 (1). – P. 2-4.

76. Al-Abrash, A.S. Catalase evaluation in different human diseases associated with oxidative stress / A.S. Al-Abrash, F.A. Al-Quobaili, G.N. Al-Akhras // Saudi Med. J. – 2000. – Vol. 21 (9). – P. 826-830.

77. Allen, E.M. Protein-thiol oxidation and cell death: regulatory role of glutaredoxins / E.M. Allen, J.J. Mieyal // Antioxid. Redox Signal. – 2012. – Vol. 17 (12). – P. 1748-1763.

78. An, N. Thioredoxin and hematologic malignancies / N. An, Y. Kang // Adv. Cancer Res. – 2014. – Vol. 122. – P. 245-279.

79. Anandamide inhibits cholangiocyte hyperplastic proliferation via activation of thioredoxin 1/redox factor 1 and AP-1 activation / S. DeMorrow, H. Francis, E. Gaudio et al. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2008. – Vol. 294 (2). – P. G506-G519.

80. Anelli, T. Protein quality control in the early secretory pathway / T. Anelli, R. Sitia // EMBO J. – 2008. – Vol. 27 (2). – P. 315-327.

81. Antagonism between MCL-1 and PUMA governs stem/progenitor cell survival during hematopoietic recovery from stress / A.R. Delbridge, J.T. Opferman, S. Grabow, A. Strasser // Blood. – 2015. – Vol. 125 (21). – P. 3273-3280.

82. Anticancer drugs for the modulation of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress / A.A. Farooqi, K.T. Li, S. Fayyaz et al. // Tumour Biol. – 2015. – Vol. 36 (8). – P. 5743-5752.

83. Antioxidant activity of caffeoyl-prolyl-histidine amide and its effects on PDGF-induced proliferation of vascular smooth muscle cells / S.Y. Kwak, H.J. Lee, J.K. Yang et al. // Amino Acids. – 2014. – Vol. 46 (12). – P. 2777-2785.

84. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress / C. Espinosa-Diez, V. Miguel, D. Mennerich et al. // Redox Biol. – 2015. – Vol. 6. – P. 183-197.

85. Antioxidants and human diseases / P. Rajendran, N. Nandakumar, T. Rengarajan et al. // Clin. Chim. Acta. – 2014. – Vol. 436. – P. 332-347.

86. Antiproliferative effects of mitochondria-targeted cationic antioxidants and analogs: role of mitochondrial bioenergetics and energy-sensing mechanism / G. Cheng, J. Zielonka, D. McAllister et al. // *Cancer Lett.* – 2015. – Vol. 365 (1). – P. 96-106.
87. Apaf 1 inhibition promotes cell recovery from apoptosis / A. Gortat, M. Sancho, L. Mondragón et al. // *Protein Cell.* – 2015. – Vol. 6 (11). – P. 833-843.
88. Apoptosis: role in myeloid cell development / S. Sarvothaman, R.B. Undi, S.R. Pasupuleti et al. // *Blood Res.* – 2015. – Vol. 50 (2). – P. 73-79.
89. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer / M. Hassan, H. Watari, A. AbuAlmaaty et al. // *Biomed Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 150845.
90. Apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 2 functions as a mitogen-activated protein kinase in a heteromeric complex with ASK1 / K. Takeda, R. Shimosono, T. Noguchi et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282 (10). – P. 7522-7531.
91. Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide / A.M. Gardner, F.H. Xu, C. Fady et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 1997. – Vol. 22 (1-2). – P. 73-83.
92. Arnér, E.S. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase / E.S. Arnér, A. Holmgren // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – Vol. 267 (20). – P. 6102-6109.
93. Arya, R. Heat shock genes – integrating cell survival and death / R. Arya, M. Mallik, S.C. Lakhotia // *J. Biosci.* – 2007. – Vol. 32 (3). – P. 595-610.
94. Ashkenazi, A. Death receptors: signaling and modulation / A. Ashkenazi, V.M. Dixit // *Science.* – 1998. – V. 281 (5381). – P. 1305-1308.
95. Aslan, M. Modulation of redox pathways in neutrophils from sickle cell disease patients / M. Aslan, D. Canatan // *Exp. Hematol.* – 2008. – Vol. 36 (11). – P. 1535-1544.
96. Autophagy-related deubiquitinating enzymes involved in health and disease / F.E. Magraoui, C. Reidick, H.E. Meyer, H.W. Platta // *Cells.* – 2015. – Vol. 4

(4). – P. 596-621.

97. Bak, D.W. Cysteine-mediated redox signalling in the mitochondria / D.W. Bak, E. Weerapana // *Mol. Biosyst.* – 2015. – Vol. 11 (3). – P. 678-697.

98. Bakthisaran, R. Small heat shock proteins: role in cellular functions and pathology / R. Bakthisaran, R. Tangirala, C.M. Rao // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – Vol. 1854 (4). – P. 291-319.

99. Balasubramanian, B. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone / B. Balasubramanian, W.K. Pogozelski, T.D. Tullius // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95 (17). – P. 9738-9743.

100. Basal c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase activity is essential for survival and proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells / J. Cui, Q. Wang, J. Wang et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2009. – Vol. 8 (12). – P. 3214-3222.

101. BCL2 promotor methylation and miR-15a/16-1 upregulation is associated with sanguinarine-induced apoptotic death in rat HSC-T6 cells / D.S. Zhang, Y.Y. Li, X.J. Chen et al. // *J. Pharmacol. Sci.* – 2015. – Vol. 127 (1). – P. 135-144.

102. Beere, H.M. «The stress of dying»: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis / H.M. Beere // *Cell Sci.* – 2004. – Vol. 117, Pt. 13. – P. 2641-2651.

103. Berlett, B.S. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress / B.S. Berlett, E.R. Stadtman // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272 (33). – P. 20313-20316.

104. Bhattacharyya, S. Tumour, oxidative stress and host T cell response: cementing the dominance / S. Bhattacharyya, J. Saha // *Scand. J. Immunol.* – 2015. – Vol. 82 (6). – P. 477-488.

105. Bignold, L.P. Mechanism of separation of polymorphonuclear leukocytes from whole blood by the one-step Hypaque-Ficoll method / L.P. Bignold, A. Ferrante // *J. Immunol. Methods.* – 1987. – Vol. 96 (1). – P. 29-33.

106. Bindoli, A. Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling / A. Bindoli, J.M. Fukuto, H.J. Forman // *Antioxid. Redox Signal.* – 2008. – Vol. 10 (9).

– P. 1549-1564.

107. Blocking tumor cell migration and Invasion with biphenyl isoxazole derivative KRIBB3, a synthetic molecule that inhibits Hsp27 phosphorylation / K.D. Shin, M. Lee, D. Shin et al. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280 (50). – P. 41439-41448.

108. Boland, M.L. Mitochondrial dysfunction in cancer / M.L. Boland, A.H. Chourasia, K.F. Macleod // *Front Oncol.* – 2013. – Vol. 3. – P. 292.

109. Bollineni, R.C. Proteome-wide profiling of carbonylated proteins and carbonylation sites in HeLa cells under mild oxidativestress conditions / R.C. Bollineni, R. Hoffmann, M. Fedorova // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – Vol. 68. – P. 186-195.

110. Borges, C.R. Oxidative protein folding: nature's knotty challenge / C.R. Borges, D.F. Lake // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014. – Vol. 21 (3). – P. 392-395.

111. Bozaykut, P. Regulation of protein turnover by heat shock proteins / P. Bozaykut, N.K. Ozer, B. Karademir // *Free Radic. Biol. Med.* – 2014. – Vol. 77. – P. 195-209.

112. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.

113. Brunelli, L. The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli* / L. Brunelli, J.P. Crow, J.S. Beckman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1995. – Vol. 316 (1). – P. 327-334.

114. Cabiscol, E. Carbonic anhydrase III / E. Cabiscol, R.L. Levine // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270 – P. 14742-14747.

115. Cadet, J. Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation / J. Cadet, T. Douki, J.L. Ravanat // *Photochem. Photobiol.* – 2015. – Vol. 91 (1). – P. 140-155.

116. Caino, M.C. Molecular pathways: mitochondrial reprogramming in tumor progression and therapy / M.C. Caino, D.C. Altieri // *Clin. Cancer Res.* – 2016. – Vol. 22 (3). – P. 540-545.

117. Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death / G. Bhosale, J.A. Sharpe, S.Y. Sundier, M.R. Duchon // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2015. – Vol. 1350. – P. 107-116.
118. Cambogin induces caspase-independent apoptosis through the ROS/JNK pathway and epigenetic regulation in breast cancer cells / K. Shen, J. Xie, H. Wang et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2015. – Vol. 14 (7). – P. 1738-1749.
119. Caplan, A.J. What is a co-chaperone? / A.J. Caplan // *Cell Stress Chaperones.* – 2003. – Vol. 8 (2). – P. 105-107.
120. Casado, A. Age-correlated changes of erythrocyte activiti in the Spanish population // A. Casado, M.E. Lopez-Fernandez // *Gerontology.* – 2003. – Vol. 49 (4). – P. 251-255.
121. Caspase 3 attenuates XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)-mediated inhibition of caspase 9 / J.B. Denault, B.P. Eckelman, H. Shin et al. // *Biochem J.* – 2007. – V. 405 (1). – P. 11-19.
122. Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer / X. Wen, Z.Q. Lin, B. Liu, Y.Q. Wei // *Cell Prolif.* – 2012. – Vol. 45 (3). – P. 217-224.
123. Castanié-Cornet, M.P. Chaperone networking facilitates protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane / M.P. Castanié-Cornet, N. Bruel, P. Genevax // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1843 (8). – P. 1442-1456.
124. Cell proliferation induced by reactive oxygen species is mediated via mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells / M.J. Han, B.Y. Kim, S.O. Yoon, A.S. Chung // *Mol. Cells.* – 2003. – Vol. 15 (1). – P. 94-101.
125. Cell-fate determination by ubiquitin-dependent regulation of translation / A. Werner, S. Iwasaki, C.A. McGourty et al. // *Nature.* – 2015. – Vol. 525 (7570). – P. 523-527.
126. Chatterjee, A. Reduced glutathione: a radioprotector or a modulator of DNA-repair activity? / A. Chatterjee // *Nutrients.* – 2013. – Vol. 5 (2). – P. 525-542.

127. Chaugule, V.K. Specificity and disease in the ubiquitin system / V.K. Chaugule, H. Walden // *Biochem. Soc. Trans.* – 2016. – Vol. 44 (1). – P. 212-227.
128. Chen, Y. Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? / Y. Chen, S.B. Gibson // *Autophagy.* – 2008. – Vol. 4 (2). – P. 246-248.
129. Chen, Y.R. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation / Y.R. Chen, J.L. Zweier // *Circ. Res.* – 2014. – Vol. 114 (3). – P. 524-537.
130. Chu, F. PKC isozyme S-cysteinylation by cystine stimulates the proapoptotic isozyme RKC $\delta$  and inactivates the oncogenic isozyme PKC $\epsilon$  / F. Chu, N.E. Ward, C.A. O'Brian // *Carcinogenesis.* – 2003. – Vol. 24 (2). – P. 317-325.
131. c-IAP ubiquitin protein ligase activity is required for 4-1BB signaling and CD8(+) memory T-cell survival / M.L. Giardino Torchia, I. Munitic, E. Castro et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2015. – Vol. 45 (9). – P. 2672-2682.
132. Ciocca, D.R. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications / D.R. Ciocca, S.K. Calderwood // *Cell Stress Chaperones.* – 2005. – Vol. 10 (2). – P. 86-103.
133. Clematichinoside inhibits VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNF- $\alpha$ -treated endothelial cells via NADPH oxidase-dependent I $\kappa$ B kinase/NF- $\kappa$ B pathway / S. Yan, X. Zhang, H. Zheng et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2015. – Vol. 78. – P. 190-201.
134. Cohen, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis / G.M. Cohen // *Biochem. J.* – 1997. – Vol. 326, Pt. 1. – P. 1-16.
135. Common and specific mechanisms of AAA+ proteins involved in protein quality control / A. Mogk, T. Haslberger, P. Tessarz, B. Bukau // *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – Vol 36, Pt. 1. – P. 120-125.
136. Cooper, J.A. Cell regulation by phosphotyrosine-targeted ubiquitin ligases / J.A. Cooper, T. Kaneko, S.S. Li // *Mol. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 35 (11). – P. 1886-1897.
137. Csermely, P. Chaperones as parts of cellular networks / P. Csermely, C. Söti, G.L. Blatch // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2007. – Vol. 594. – P. 55-63.

138. Cui-Hua, L. New insights into the role of the ubiquitin-proteasome pathway in the regulation of apoptosis / L. Cui-Hua, A.L. Goldberg, Q. Xiao-Bo // *Chang Gung Med. J.* – 2007. – Vol. 30 (6). – P. 469-479.
139. CUL4B impedes stress-induced cellular senescence by dampening a p53-reactive oxygen species positive feedback loop / Z. Wei, H. Guo, Z. Liu et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2014. – Vol. 79. – P. 1-13.
140. CYLD-mediated signaling and diseases / B.J. Mathis, Y. Lai, C. Qu et al. // *Curr. Drug Targets.* – 2015. Vol. 16 (4). – P. 284-294.
141. Cyr, A.R. Regulation of SOD2 in cancer by histone modifications and CpG methylation: closing the loop between redox biology and epigenetics / A.R. Cyr, M.J. Hitchler, F.E. Domann // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 18 (15). – P. 1946-1955.
142. Cyr, D.M. Specification of Hsp70 function by type I and type II Hsp40 / D.M. Cyr, C.H. Ramos // *Subcell. Biochem.* – 2015. – Vol. 78. – P. 91-102.
143. Dahlmann, B. Role of proteasomes in disease / B. Dahlmann // *BMC Biochemistry.* – 2007. – Vol. 8, Suppl. 1. – P. S3.
144. Dashzeveg, N. Cell death decision by p53 via control of the mitochondrial membrane / N. Dashzeveg, K. Yoshida // *Cancer Lett.* – 2015. – Vol. 367 (2). – P. 108-112.
145. Davies, K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. 1. General aspects / K.J. Davies // *J. Biol. Chem.* – 1987. – Vol. 262 (20). – P. 9895-9901.
146. De Boer, H.R. Controlling the response to DNA damage by the APC/C-Cdh1 / H.R. de Boer, S. Guerrero Llobet, M.A. van Vugt // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2016. – Vol. 73 (15). – P. 2985-2998.
147. DED or alive: assembly and regulation of the death effector domain complexes / J.S. Riley, A. Malik, C. Holohan, D.B. Longley // *Cell Death Dis.* – 2015. – Vol. 6. – P. e1866.
148. Denatonium inhibits growth and induces apoptosis of airway epithelial

cells through mitochondrial signaling pathways / X. Wen, J. Zhou, D. Zhang et al. // *Respir. Res.* – 2015. – Vol. 16. – P. 13.

149. Design and synthesis of new substrates of HtrA2 protease / M. Wysocka, A. Wojtysiak, M. Okońska et al. // *Anal. Biochem.* – 2015. – Vol. 475. – P. 44-52.

150. Dexamethasone apoptosis induction and glucocorticoid receptor levels in cultured normal and neoplastic cell lines / L. Sciola, A. Spano, G. Monaco et al. // *Int. J. Oncol.* – 1997. – Vol. 11 (5). – P. 999-1005.

151. Díaz, V.M. Regulation of the protein stability of EMT transcription factors / V.M. Díaz, R. Viñas-Castells, A. García de Herreros // *Cell Adh. Migr.* – 2014. – Vol. 8 (4). – P. 418-428.

152. Different anti-oxidant effects of thioredoxin 1 and thioredoxin 2 in retinal epithelial cells / E. Sugano, H. Isago, N. Murayama et al. // *Cell Struct. Funct.* – 2013. – Vol. 38 (1). – P. 81-88.

153. Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion / H. Sato, M. Shibata, T. Shimizu et al. // *Neuroscience.* – 2013. – Vol. 248. – P. 345-358.

154. Differential membrane antioxidant effects of immediate and long-term estradiol treatment of MCF-7 breast cancer cells / N.F. Schor, Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, V.E. Kagan // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – Vol. 260 (2). – P. 410-415.

155. Disulfide bond requirements for active wnt ligands / B.T. MacDonald, A. Hien, X. Zhang et al. // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289 (26). – P. 18122-18136.

156. Disulfide stress: a novel type of oxidative stress in acute pancreatitis / M.L. Moreno, J. Escobar, A. Izquierdo-Álvarez et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2014. – Vol. 70. – P. 265-277.

157. Downregulation of glutaredoxin but not glutathione loss leads to mitochondrial dysfunction in female mice CNS: implications in excitotoxicity / L. Diwakar, R.S. Kenchappa, J. Annepu, V. Ravindranath // *Neurochem. Int.* – 2007. – Vol. 51 (1). – P. 37-46.

158. Driscoll, P.C. Structural studies of death receptors / P.C. Driscoll // *Meth. Enzymol.* – 2014. – Vol. 545. – P. 201-242.
159. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity / A.L. Joly, G. Wettstein, G. Mignot et al. // *J. Innate Immun.* – 2010. – Vol. 2 (3). – P. 238-247.
160. Eaton, J.W. Catalases and peroxidase and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary / J.W. Eaton // *J. Lab. and Clin. Med.* – 1991. – Vol. 118 (1). – P. 3-4.
161. Edkins, A.L. CHIP: a co-chaperone for degradation by the proteasome / A.L. Edkins // *Subcell. Biochem.* – 2015. – Vol. 78. – P. 219-242.
162. EGF receptor exposed to oxidative stress acquires abnormal phosphorylation and aberrant activated conformation that impairs canonical dimerization / S. Filosto, E.M. Khan, E. Tognon et al. // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6 (8). – P. e23240.
163. Elguindy, M.M. Apoptosis-inducing factor (AIF) and its family member protein, AMID, are rotenone-sensitive NADH: ubiquinone oxidoreductases (NDH-2) / M.M. Elguindy, E. Nakamaru-Ogiso // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290 (34). – P. 20815-20826.
164. Ellis, R.J. Protein folding: inside the cage / R.J. Ellis // *Nature.* – 2006. – Vol. 442 (7101). – P. 360-362.
165. Epalrestat increases glutathione, thioredoxin, and heme oxygenase-1 by stimulating Nrf2 pathway in endothelial cells / K. Yama, K. Sato, N. Abe et al. // *Redox Biol.* – 2015. – Vol. 4. – P. 87-96.
166. Epithelial NAIPs protect against colonic tumorigenesis / R. Allam, M.H. Maillard, A. Tardivel et al. // *J. Exp. Med.* – 2015. – Vol. 212 (3). – P. 369-383.
167. Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells / P. Pietarinen-Runtti, E. Lakari, K.O. Raivio, V.L. Kinnula / *J. Physiol. Cell Physiol.* – 2000. – Vol. 278 (1). – P. 118-125.
168. Expression of UBE2Q2, a putative member of the ubiquitin-conjugating

enzyme family in pediatric acute lymphoblastic leukemia / A. Seghatoleslam, A. Monabati, F. Bozorg-Ghalati et al. // Arch. Iran. Med. – 2012. – Vol. 15 (6). – P. 352-355.

169. Factors associated with nitric oxide-mediated  $\beta 2$  integrin inhibition of neutrophils / V.M. Bhopale, M. Yang, K. Yu, S.R. Thom // J. Biol. Chem. – 2015. – Vol. 290 (28). – P. 17474-17484.

170. Fadok, V.A. Apoptosis: giving phosphatidylserine recognition an assist – with a twist / V.A. Fadok, P.M. Henson // Curr. Biol. – 2003. – Vol. 13 (16). – P. R655-R657.

171. Fenton, H.J.H. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron / H.J.H. Fenton // J. Chem. Soc. – 1894. – Vol. 65. – P. 899-910.

172. Fil'chenkov, A.A. Apoptosis-reactivating agents for targeted anticancer therapy / A.A. Fil'chenkov // Biomed. Khim. – 2013. – Vol. 59 (2). – P. 119-143.

173. Finlay, D.K. Metabolic regulation of natural killer cells / D.K. Finlay // Biochem. Soc. Trans. – 2015. – Vol. 43 (4). – P. 758-762.

174. Flusberg, D.A. Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells / D.A. Flusberg, P.K. Sorger // Trends Cell Biol. – 2015. – Vol. 25 (8). – P. 446-458.

175. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer / M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol et al. // Chem. Biol. Interact. – 2006. – Vol. 160 (1). – P. 1-40.

176. Fritsch, K. Suppression of granzyme B activity and caspase-3 activation in leukaemia cells constitutively expressing the protease inhibitor 9 / K. Fritsch, J. Finke, C. Grüllich // Ann. Hematol. – 2013. – Vol. 92 (12). – P. 1603-1609.

177. Fulda, S. Smac mimetics as IAP antagonists / S. Fulda // Semin. Cell Dev. Biol. – 2015. – Vol. 39. – P. 132-138.

178. Gabbita, S.P. Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction / S.P. Gabbita, K.A. Robinson, C.A. Stewart // Arch. Biochem. Biophys. – 2000. – Vol. 376 (1). – P. 1-13.

179. Gajate, C. Lipid raft-mediated Fas/CD95 apoptotic signaling in leukemic

cells and normal leukocytes and therapeutic implications / C. Gajate, F. Mollinedo // *J. Leukoc. Biol.* – 2015. – Vol. 98 (5). – P. 739-759.

180. Gajate, C. Lipid rafts and raft-mediated supramolecular entities in the regulation of CD95 death receptor apoptotic signaling / C. Gajate, F. Mollinedo // *Apoptosis.* – 2015. – Vol. 20 (5). – P. 584-606.

181. Gallagher, P.J. Post-translational regulation of the cellular levels of DAPK / P.J. Gallagher, E.K. Blue // *Apoptosis.* – 2014. – Vol. 19 (2). – P. 306-315.

182. General aspects of metal toxicity / H. Kozłowski, P. Kolkowska, J. Watly et al. // *Curr. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 21 (33). – P. 3721-3740.

183. Generation of a proteolytic signal: E3/E2-mediated polyubiquitination of I $\kappa$ B $\alpha$  / R.A. Chong, K. Wu, J. Kovacev, Z.Q. Pan // *Methods Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 1280. – P. 339-354.

184. Genevoux, P. The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions / P. Genevoux, C. Georgopoulos, W.L. Kelley // *Mol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 66 (4). – P. 840-857.

185. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions / C. Spagnuolo, G.L. Russo, I.E. Orhan et al. // *Adv. Nutr.* – 2015. – Vol. 6 (4). – P. 408-419.

186. Glasauer, A. Targeting antioxidants for cancer therapy / A. Glasauer, N.S. Chandel // *Biochem. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 92 (1). – P. 90-101.

187. Glauser, T.A. Racial differences in free radical scavenging enzyme activity in children / T.A. Glauser, M. Titanic-Schefft, C.E. Pippenger // *J. Child. Neurol.* – 1999. – Vol. 14 (6). – P. 382-389.

188. Glutaredoxin 2 reduces both thioredoxin 2 and thioredoxin 1 and protects cells from apoptosis induced by auranofin and 4-hydroxynonenal / H. Zhang, Y. Du, X. Zhang et al. // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014. – Vol. 21 (5). – P. 669-681.

189. Glutaredoxin s12: unique properties for redox signaling / M. Zaffagnini, M. Bedhomme, C.H. Marchand et al. // *Antioxid. Redox Signal.* – 2012. – Vol. 16 (1). – P. 17-32.

190. Glutathione adducts on sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase Cys-674 regulate endothelial cellcalcium stores and angiogenic function as well as promote ischemic blood flow recovery / M.D. Thompson, Y. Mei, R.M. Weisbrod et al. // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289 (29). – P. 19907-19916.
191. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression / I.S. Harris, A.E. Treloar, S. Inoue et al. // *Cancer Cell.* – 2015. – Vol. 27 (2). – P. 211-222.
192. Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems / S. Casagrande, V. Bonetto, M. Fratelli et. al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99 (15). – P. 9745-9749.
193. Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding / E. Pineda-Molina, P. Klatt, J. Vázquez et al. // *Biochemistry.* – 2001. – Vol. 40 (47). – P. 14134-14142.
194. Gordon, D.M. Mechanisms of mitochondrial protein import / D.M. Gordon, A. Dancis, D. Pain // *Essays Biochem.* – 2000. – Vol. 36. – P. 61-73.
195. Goswami, S.K. Cellular redox, epigenetics and diseases / S.K. Goswami // *Subcell. Biochem.* – 2013. – Vol. 61. – P. 527-542.
196. Gottlieb, R.A. Mitochondria: execution central / R.A. Gottlieb // *FEBS Lett.* – 2000. – Vol. 482 (1-2). – P. 6-12.
197. Green, D.R. Cell biology. Metabolic control of cell death / D.R. Green, L. Galluzzi, G. Kroemer // *Science.* – 2014. – Vol. 345 (6203). – P. 1250256.
198. Green, D.R. Mitochondria and apoptosis / D.R. Green, J.C. Reed // *Science.* – 1998. – Vol. 281 (5381). – P.1309-1312.
199. Groll, M. Proteasome structure, function, and lessons learned from beta-lactone inhibitors / M. Groll, B.C. Potts // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 11 (23). – P. 2850-2878.
200. Gupta, S. Molecular steps of tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis / S. Gupta // *Curr. Mol. Med.* – 2001. – Vol. 1 (3). – P. 317-324.
201. Häcker, H.G. Allosteric modulation of caspases / H.G. Häcker,

M.T. Sisay, M. Gütschow // *Pharmacol. Ther.* – 2011. – Vol. 132 (2). – P. 180-195.

202. Hagn, M. A colorimetric assay that specifically measures granzyme B proteolytic activity: hydrolysis of Boc-Ala-Ala-Asp-S-Bzl / M. Hagn, V.R. Sutton, J.A. Trapani // *J. Vis. Exp.* – 2014. – Vol. 93. – P. e52419.

203. Halliwell, B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls / B. Halliwell // *Biochem. J.* – 2014. – Vol. 37 (3). – P. 99-105.

204. Halliwell, B. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? / B. Halliwell, M. Whiteman // *Br. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 142 (2). – P. 231-255.

205. Halliwell, B. Superoxide, iron, vascular endothelium and reperfusion injury / B. Halliwell // *Free Radic. Res. Commun.* – 1989. – Vol. 5 (6). – P. 315-318.

206. Hampton, M.B. Peroxiredoxins and the regulation of cell death / M.B. Hampton, K.M. O'Connor // *Mol. Cells.* – 2016. – Vol. 39 (1). – P. 72-76.

207. Harwood, D.T. Production of glutathione sulfonamide and dehydroglutathione from GSH by myeloperoxidase-derived oxidants and detection using a novel LC-MS/MS method / D.T. Harwood, A.J. Kettle, C.C. Winterbourn // *Biochem. J.* – 2006. – Vol. 399 (1). – P. 161-168.

208. Hatfield, M.P. Role of Hsp70 in cancer growth and survival / M.P. Hatfield, S. Lovas // *Protein Pept. Lett.* – 2012. – Vol. 19 (6). – P. 616-624.

209. Hawkes, H.J. Regulation of the human thioredoxin gene promoter and its key substrates: a study of functional and putative regulatory elements / H.J. Hawkes, T.C. Karlenius, K.F. Tonissen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1840 (1). – P. 303-314.

210. Hawkins, C.L. Generation and propagation of radical reactions on proteins / C.L. Hawkins, M.J. Davies // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – Vol. 1504 (2-3). – P. 196-219.

211. Hayes, J.D. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress / J.D. Hayes, L.I. McLellan // *Free Radic. Res.* – 1999. – Vol. 31 (4). – P. 273-300.

212. Headlam, H.A. Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products / H.A. Headlam, M.J. Davies // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – Vol. 36 (9). – P. 1175-1184.
213. Heat shock protein 27 promotes cell proliferation through activator protein-1 in lung cancer / S. Zhang, Y. Hu, Y. Huang et al. // *Oncol. Lett.* – 2015. – Vol. 9 (6). – P. 2572-2576.
214. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities / G. Shuhong, W. Wharton, P. Moseley, H. Shi // *Cell Stress Chaperones.* – 2007. – Vol. 12 (3). – P. 245-254.
215. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation / D. Lanneau, M. Brunet, E. Frisan et al. // *J. Cell. Mol. Med.* – 2008. – Vol. 12 (3). – P. 743-761.
216. Heat shock proteins in hematopoietic malignancies / H. Mjahed, F. Girodon, M. Fontenay, C. Garrido // *Exp. Cell Res.* – 2012. – Vol. 318 (15). – P. 1946-1958.
217. Heat-shock protein expression in leukemia / L. Sedlackova, M. Spacek, E. Holler et al. // *Tumour Biol.* – 2011. – Vol. 32 (1). – P. 33-44.
218. Hensley, K. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury / K. Hensley, K.A. Robinson, S.P. Gabbita // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 28 (10). – P. 1456-1462.
219. Herhaus, L. Expanding the ubiquitin code through post-translational modification / L. Herhaus, I. Dikic // *EMBO Rep.* – 2015. – Vol. 16 (9). – P. 1071-1083.
220. Herrmann, J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation / J. Herrmann, L.O. Lerman, A. Lerman // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 100 (9). – P. 1276-1291.
221. Hidalgo, F.J. Intermediate role of  $\alpha$ -keto acids in the formation of strecker aldehydes / F.J. Hidalgo, R.M. Delgado, R. Zamora // *Food Chem.* – 2013. – Vol. 141 (2). – P. 1140-1146.

222. High glutathione and glutathione peroxidase-2 levels mediate cell-type-specific DNA damage protection in human induced pluripotent stem cells / B. Dannenmann, S. Lehle, D.G. Hildebrand et al. // *Stem Cell Reports*. – 2015. – Vol. 4 (5). – P. 886-898.

223. Hill, B.G. Protein S-glutathiolation: redox-sensitive regulation of protein function / B.G. Hill, A. Bhatnagar // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2012. – Vol. 52 (3). – P. 559-567.

224. Hintze, K.J. Phytochemicals in broccoli transcriptionally induce thioredoxin reductase / K.J. Hintze, K. Wald, J.W. Finley // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – Vol. 53 (14). – P. 5535-5540.

225. How hsp70 molecular machines interact with their substrates to mediate diverse physiological functions / E.M. Clerico, J.M. Tilitsky, W. Meng, L.M. Gierasch // *J. Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 427 (7). – P. 1575-1588.

226. HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy / X. Wang, M. Chen, J. Zhou, X. Zhang // *Int. J. Oncol.* – 2014. – Vol. 45 (1). – P. 18-30.

227. HSP70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor  $\kappa$ B to inhibit inflammatory signaling / T. Tanaka, A. Shibazaki, R. Ono, T. Kaisho // *Sci. Signal.* – 2014. – Vol. 7 (356). – P. ra119.

228. Hsp70 protein complexes as drug targets / V.A. Assimon, A.T. Gillies, J.N. Rauch, J.E. Gestwicki // *Curr. Pharm. Des.* – 2013. – Vol. 19 (3). – P. 404-417.

229. Huang, C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy / C. Huang, C. Freter // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16 (1). – P. 924-949.

230. Human caspase 7 is positively controlled by SREBP-1 and SREBP-2 / L. Gibot, J. Follet, J.P. Metges et al. // *Biochem. J.* – 2009. – Vol. 420 (3). – P. 473-483.

231. Human heat shock protein 27 exacerbates ischemia reperfusion injury in rats by reducing the number of T regulatory cells / S. Ye, C. Zhang, J. Zhou et al. // *Mol. Med. Rep.* – 2014. – Vol. 9 (5). – P. 1998-2002.

232. Hydrogen peroxide – production, fate and role in redox signaling of tumor cells / C. Lennicke, J. Rahn, R. Lichtenfels et al. // *Cell Commun. Signal.* – 2015.

– Vol. 13. – P. 39.

233. Hydrogen peroxide inhibits transforming growth factor- $\beta$ 1-induced cell cycle arrest by promoting Smad3 linker phosphorylation through activation of Akt-ERK1/2-linked signaling pathway / J. Choi, S.J. Park, E.J. Jo et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – Vol. 435 (4). – P. 634-639.

234. Igea, A. The stress kinase p38 $\alpha$  as a target for cancer therapy / A. Igea, A.R. Nebreda // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75 (19). – P. 3997-4002.

235. Impairment of Na(+),K(+)-ATPase in CD95(APO-1)-induced human T-cell leukemia cell apoptosis mediated by glutathione depletion and generation of hydrogen peroxide / W. Yin, W. Cheng, W. Shen et al. // *Leukemia.* – 2007. – Vol. 21 (8). – P. 1669-1678.

236. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid / K.S. Yang, S.W. Kang, H.A. Woo et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277 (41). – P. 38029-38036.

237. Influence of induced heat stress on HSP70 in buffalo lymphocytes / A. Mishra, O.K. Hooda, G. Singh, S.K. Meur // *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.).* – 2011. – Vol. 95 (4). – P. 540-544.

238. Inhibitors of apoptotic proteins: new targets for anticancer therapy / M. Saleem, M.I. Qadir, N. Perveen et al. // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2013. – Vol. 82 (3). – P. 243-251.

239. Innate lymphoid cells in cancer / B. Vallentin, V. Barlogis, C. Piperoglou et al. // *Cancer Immunol. Res.* – 2015. – Vol. 3 (10). – P. 1109-1114.

240. Inoue, T. Mitochondrial superoxide mediates mitochondrial and endoplasmic reticulum dysfunctions in TRAIL-induced apoptosis in Jurkat cells / T. Inoue, Y. Suzuki-Karasaki // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – Vol. 61. – P. 273-284.

241. Integrin-linked kinase mediates the hydrogen peroxide-dependent transforming growth factor- $\beta$ 1 up-regulation / M. Gonzalez-Ramos, S. de Frutos, M. Griera et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – Vol. 61. – P. 416-427.

242. Irreversible inactivation of proteine kinase C by glutathione / N.E. Ward, D.S. Pierce, S.E. Chung et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273 (20). – P. 12558-12566.
243. Iwai, K. Diverse ubiquitin signaling in NF- $\kappa$ B activation / K. Iwai // *Trends Cell Biol.* – 2012. – Vol. 22 (7). – P. 355-364.
244. Jaiswal, P.K. Survivin: a molecular biomarker in cancer / P.K. Jaiswal, A. Goel, R.D. Mittal // *Indian J. Med. Res.* – 2015. – Vol. 141 (4). – P. 389-397.
245. Jomova, K. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease / K. Jomova, M. Valko // *Toxicology.* – 2011. – Vol. 283 (2-3). – P. 65-87.
246. Jones, D.P. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress / D.P. Jones // *Chem. Biol. Interact.* – 2006. – Vol. 163 (1-2). – P. 38-53.
247. Kaigorodova, E.V. Heat shock proteins as prognostic markers of cancer / E.V. Kaigorodova, M.V. Bogatyuk // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2014. – Vol. 14 (8). – P. 713-726.
248. Kalinina, E.V. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes / E.V. Kalinina, N.N. Chernov, M.D. Novichkova // *Biochemistry (Mosc).* – 2014. – Vol. 79 (13). – P. 1562-1583.
249. Kaminsky, V.O. Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis / V.O. Kaminsky, B. Zhivotovsky // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014. – Vol. 21 (1). – P. 86-102.
250. Karch, J. Regulated necrotic cell death: the passive aggressive side of Bax and Bak / J. Karch, J.D. Molkenin // *Circ. Res.* – 2015. – Vol. 116 (11). – P. 1800-1809.
251. Kastle, M. Protein oxidative modification in the aging organism and the role of the ubiquitin proteasomal system / M. Kastle, T. Grune // *Curr. Pharm. Des.* – 2011. – Vol. 17 (36). – P. 4007-4022.
252. Katusic, Z.S. Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind / Z.S. Katusic, S.A. Austin // *Eur. Heart J.* – 2014. – Vol. 35 (14). – P. 888-894.
253. Kaufmann, T. Fas death receptor signaling: roles of Bid and XIAP /

T. Kaufmann, A. Strasser, P.J. Jost // *Cell Death Differ.* – 2012. – Vol. 19 (1). – P. 42-50.

254. Kee, Y. Role of deubiquitinating enzymes in DNA repair / Y. Kee, T.T. Huang // *Mol. Cell. Biol.* – 2015. – Vol. 36 (4). – P. 524-544.

255. Kemp, M. Recent advances in the discovery of deubiquitinating enzyme inhibitors / M. Kemp // *Prog. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 55. – P. 149-192.

256. Kern, J.C. Free radicals and apoptosis: relationships with glutathione, thioredoxin, and the BCL family of proteins / J.C. Kern, J.P. Kehrer // *Front. Biosci.* – 2005. – Vol. 10. – P. 1727-1738.

257. Khaminets, A. Ubiquitin-dependent and independent signals in selective autophagy / A. Khaminets, C. Behl, I. Dikic // *Trends Cell Biol.* – 2016. – Vol. 26 (1). – P. 6-16.

258. Khurana, N. Hsp90, the concertmaster: tuning transcription / N. Khurana, S. Bhattacharyya // *Front Oncol.* – 2015. – Vol. 5. – P. 100.

259. Kim, B.Y. Effects of reactive oxygen species on proliferation of chinese hamster lung fibroblast (V79) cells / B.Y. Kim, M.J. Han, A.S. Chung // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – Vol. 30 (6). – P. 686-698.

260. Kim, D.H. Redox modulation of p53: mechanisms and functional significance / D.H. Kim, J.K. Kundu, Y.J. Surh // *Mol. Carcinog.* – 2011. – Vol. 50 (4). – P. 222-234.

261. Kinetics and mechanism of the [Ru(III)(edta)(H<sub>2</sub>O)](-)-mediated oxidation of cysteine by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / D. Chatterjee, E. Ember, U. Pal et al. // *Dalton Trans.* – 2011. – Vol. 40 (41). – P. 10997-101004.

262. Kojima, S. Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth / S. Kojima, K. Nakayama, H. Ishida // *J. Radiat. Res.* – 2004. – Vol. 45 (1). – P. 33-39.

263. Kopin, I. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine / I. Kopin, D. Goldstein // *Pharmacol. Rev.* – 2004. – Vol. 56 (3). – P. 331-349.

264. Kovacic, P. Simplifying the complexity of cell signaling in medicine and the life sciences: radicals and electrochemistry / P. Kovacic // *Med. Hypotheses*. – 2010. – Vol. 74 (5). – P. 769-771.

265. KPC1-mediated ubiquitination and proteasomal processing of NF- $\kappa$ B1 p105 to p50 restricts tumor growth / Y. Kravtsova-Ivantsiv, I. Shomer, V. Cohen-Kaplan et al. // *Cell*. – 2015. – Vol. 161 (2). – P. 333-347.

266. KRIBB3, a novel microtubule inhibitor, induces mitotic arrest and apoptosis in human cancer cells / K.D. Shin, Y.J. Yoon, Y.R. Kang et al. // *Biochem. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 75 (2). – P. 383-394.

267. Landry, W.D. ROS signalling, NADPH oxidases and cancer / W.D. Landry, T.G. Cotter // *Biochem. Soc. Trans.* – 2014. – Vol. 42 (4). – P. 934-938.

268. Larini, A. Effect of 4-hydroxynonenal on antioxidant capacity and apoptosis induction in Jurkat T cells / A. Larini, L. Bianchi, V. Bocci // *Free Radic. Res.* – 2004. – Vol. 38 (5). – P. 509-516.

269. Lavrik, I.N. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC / I.N. Lavrik, P.H. Krammer // *Cell Death Differ.* – 2012. – Vol. 19 (1). – P. 36-41.

270. Leong, K.G. Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor alpha / K.G. Leong, A. Karsan // *Histol. Histopathol.* – 2000. – Vol. 15 (4). – P. 1303-1325.

271. Levine, R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease / R.L. Levine // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – Vol. 32 (9). – P. 790-796.

272. Li, M. Age-related changes in redox signaling and VSMC function / M. Li, N.K. Fukagawa // *Antioxid. Redox Signal.* – 2010. – Vol. 12 (5). – P. 641-655.

273. Liaudet, L. Role of peroxynitrite in the cardiovascular dysfunction of septic shock / L. Liaudet, N. Rosenblatt-Velin, P. Pacher // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 11 (2). – P. 196-207.

274. Localization and regulation of pancreatic selenoprotein P / H. Steinbrenner, A.L. Hotze, B. Speckmann et al. // *J. Mol. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 50 (1). – P. 31-42.

275. Lodhi, I.J. Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling / I.J. Lodhi, C.F. Semenkovich // *Cell Metab.* – 2014. – Vol. 19 (3). – P. 380-392.
276. Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins / J.A. Simpson, S. Narita, S. Gieseg et al. // *Biochem J.* – 1992. – Vol. 282, Pt. 3. – P. 621-624.
277. Lopez, J. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within / J. Lopez, S.W. Tait // *Br. J. Cancer.* – 2015. – Vol. 112 (6). – P. 957-962.
278. Lopez, T. The mechanism and function of group II chaperonins / T. Lopez, K. Dalton, J. Frydman // *J. Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 427 (18). – P. 2919-2930.
279. Lu, J. The thioredoxin antioxidant system / J. Lu, A. Holmgren // *Free Radic. Biol. Med.* – 2014. – Vol. 66. – P. 75-87.
280. Lu, J. The thioredoxin superfamily in oxidative protein folding / J. Lu, A. Holmgren // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014. – Vol. 21 (3). – P. 457-470.
281. Lu, J. Thioredoxin system in cell death progression / J. Lu, A. Holmgren // *Antioxid. Redox Signal.* – 2012. – Vol. 17 (12). – P. 1738-1747.
282. Lu, L. Bioinformatics advances in protein ubiquitination / L. Lu, D. Li, F.C. He // *Yi Chuan.* – 2013. – Vol. 35 (1). – P. 17-26.
283. Lu, S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies / S.C. Lu // *FASEB J.* – 1999. – Vol. 13 (10). – P. 1169-1183.
284. Maeda, H. The link between infection and cancer: tumor vasculature, free radicals, and drug delivery to tumors via the EPR effect / H. Maeda // *Cancer Sci.* – 2013. – Vol. 104 (7). – P. 779-789.
285. Magwere, T. Heterogeneous role of the glutathione antioxidant system in modulating the response of ESFT to fenretinide in normoxia and hypoxia / T. Magwere, S.A. Burchill // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6 (12). – P. e28558.
286. Mao, Y. Tumour-induced immune suppression: role of inflammatory mediators released by myelomonocytic cells / Y. Mao, I. Poschke, R. Kiessling //

J. Intern. Med. – 2014. – Vol. 276 (2). – P. 154-170.

287. Martínez-Reyes, I. The H(+)-ATP synthase: a gate to ROS-mediated cell death or cell survival / I. Martínez-Reyes, J.M. Cuezva // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1837 (7). – P. 1099-10112.

288. Mayer, M.P. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism / M.P. Mayer // *Trends Biochem. Sci.* – 2013. – Vol. 38 (10). – P. 507-514.

289. Mayer, M.P. Hsp90: breaking the symmetry / M.P. Mayer, L. Le Breton // *Mol. Cell.* – 2015. – Vol. 58 (1). – P. 8-20.

290. McConnell, J.R. Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets / J.R. McConnell, S.R. McAlpine // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol. 23 (7). – P. 1923-1928.

291. Mechanism-based proteomic screening identifies targets of thioredoxin-like proteins / L.S. Nakao, R.A. Everley, S.M. Marino et al. // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290 (9). – P. 5685-5695.

292. Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer / J. Cui, Y. Chen, H.Y. Wang, R.F. Wang // *Hum Vaccin Immunother.* – 2014. – Vol. 10 (11). – P. 3270-3285.

293. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease / L.E. Tebay, H. Robertson, S.T. Durant et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2015. – Vol. 88, Pt. B. – P. 108-146.

294. Meier, P. Ubiquitin-mediated regulation of cell death, inflammation, and defense of homeostasis / P. Meier, O. Morris, M. Broemer // *Curr. Top. Dev. Biol.* – 2015. – Vol. 114. – P. 209-239.

295. Melatonin overcomes apoptosis resistance in human hepatocellular carcinoma by targeting survivin and XIAP / L. Fan, G. Sun, T. Ma et al. // *J. Pineal Res.* – 2013. – Vol. 55 (2). – P. 174-183.

296. Microbial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensors as archetypical redox signaling modules / M.B. Toledano, A. Delaunay, L. Monceau, F. Tacnet // *Trends Biochem. Sci.* – 2004. –

Vol. 29 (7). – P. 351-357.

297. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes / B.R. Burchill, J.M. Oliver, C.B. Pearson et al. // *J. Cell Biol.* – 1978. – Vol. 76 (2). – P. 439-447.

298. Mine, Y. Antioxidative stress effect of phosphoserine dimers is mediated via activation of the Nrf2 signaling pathway / Y. Mine, D. Young, C. Yang // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2015. – Vol. 59 (2). – P. 303-314.

299. Mitochondrial mechanisms of endothelial dysfunction / A. Szewczyk, W. Jarmuszkiewicz, A. Koziel et al. // *Pharmacol. Rep.* – 2015. – Vol. 67 (4). – P. 704-710.

300. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide / S.W. Perry, J.P. Norman, J. Barbieri et al. // *Biotechniques.* – 2011. – Vol. 50 (2). – P. 98-115.

301. Mitochondria-targeted drug delivery system for cancer treatment / Z.P. Chen, M. Li, L.J. Zhang et al. // *J. Drug Target.* – 2016. – Vol. 24 (6). – P. 492-502.

302. Modulation of NF- $\kappa$ B and FOXOs by baicalein attenuates the radiation-induced inflammatory process in mouse kidney / E.K. Lee, J.M. Kim, J. Choi et al. // *Free Radic. Res.* – 2011. – Vol. 45 (5). – P. 507-517.

303. Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis / E. Papp, G. Nardai, C. Söti, P. Csermerly // *Biofactors.* – 2003. – Vol. 17 (1-4). – P. 249-257.

304. Molecular cloning and characterisation of the rock bream, *Oplegnathus fasciatus*, Fas (CD95/APO-1), and its expression analysis in response to bacterial or viral infection / J.M. Jeong, J.W. Kim, H.J. Park et al. // *Results. Immunol.* – 2011. – Vol. 1 (1). – P. 11-7.

305. Molecular mechanisms of superoxide production by complex III: a bacterial versus human mitochondrial comparative case study / P. Lanciano, B. Khalfaoui-Hassani, N. Selamoglu et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1827 (11-12). – P. 1332-1339.

306. Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers / Y. Wu, S. Antony, J.L. Meitzler, J.H. Doroshov // *Cancer Lett.* – 2014. – Vol. 345 (2). – P. 164-173.
307. Mollinedo, F. Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer / F. Mollinedo, C. Gajate // *Adv. Biol. Regul.* – 2015. – Vol. 57. – P. 130-146.
308. Monitoring changes in thioredoxin and over-oxidised peroxiredoxin in response to exercise in humans / A.J. Wadley, Y. Chen, S.J. Bennett et al. // *Free Radic. Res.* – 2015. – Vol. 49 (3). – P. 290-298.
309. Morgan, M.J. TNFalpha and reactive oxygen species in necrotic cell death / M.J. Morgan, Y.S. Kim, Z.G. Liu // *Cell Res.* – 2008. – Vol. 18 (3). – P. 343-349.
310. Murphy, M.E. The HSP70 family and cancer / M.E. Murphy // *Carcinogenesis.* – 2013. – Vol. 34 (6). – P. 1181-1188.
311. Mymrikov, E.V. Large potentials of small heat shock proteins / E.V. Mymrikov, A.S. Seit-Nebi, N.B. Gusev // *Physiol. Rev.* – 2011. – Vol. 91 (4). – P. 1123-1159.
312. NADPH oxidase-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production is required for salt-induced antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana* / K. Ben Rejeb, M. Benzarti, A. Debez et al. // *J. Plant Physiol.* – 2015. – Vol. 174. – P. 5-15.
313. Nagy, P. Superoxide-mediated formation of tyrosine hydroperoxides and methionine sulfoxide in peptides through radical addition and intramolecular oxygen transfer / P. Nagy, A.J. Kettle, C.C. Winterbourn // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284 (22). – P. 14723-14733.
314. Nahálková, J. Novel protein-protein interactions of TPPII, p53, and SIRT7 / J. Nahálková // *Mol. Cell. Biochem.* – 2015. – Vol. 409 (1-2). – P. 13-22.
315. Nakagawa, T. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis / T. Nakagawa, J. Yuan // *J. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 150 (4). – P. 887-894.
316. Nakamura, H. Thioredoxin as a key molecule in redox signaling /

H. Nakamura // *Antioxid. Redox Signal.* – 2004. – Vol. 6 (1). – P. 15-17.

317. Nakamura, T. Emerging role of protein-protein transnitrosylation in cell signaling pathways / T. Nakamura, S.A. Lipton // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 18 (3). – P. 239-249.

318. Natural allelic variations in glutathione peroxidase-1 affect its subcellular localization and function / S. Bera, F. Weinberg, D.N. Ekoue et al. // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 74 (18). – P. 5118-5126.

319. Nicholson, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death / D.W. Nicholson // *Cell Death Differ.* – 1999. – Vol. 6 (11). – P. 1028-1042.

320. Niemi, N.M. Mitochondrial phosphorylation in apoptosis: flipping the death switch / N.M. Niemi, J.P. MacKeigan // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 19 (6). – P. 572-582.

321. Niforou, K. Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance / K. Niforou, C. Cheimonidou, I.P. Trougakos // *Redox Biol.* – 2014. – Vol. 2. – P. 323-332.

322. Nishikawa, H. Overview: new modality for cancer treatment / H. Nishikawa // *Oncology.* – 2015. – Suppl. 1. – P. 33-35.

323. Nitric oxide attenuates insulin- or IGF-I-stimulated aortic smooth muscle cell motility by decreasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels: essential role of cGMP / D. Zhuang, A.C. Ceacareanu, Y. Lin et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – Vol. 286 (6). – P. H2103-H2112.

324. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation *in vivo* / L. Rössig, B. Fichtlscherer, K. Breitschopf et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274 (11). – P. 6823-6826.

325. Nitric oxide pathway and female lower urinary tract. Physiological and pathophysiological role / X. Gamé, P. Rischmann, J.F. Arnal, B. Malavaud // *Prog. Urol.* – 2013. – Vol. 23 (11). – P. 926-935.

326. Nitroglutathione, a product of the reaction, between peroxynitrite and

glutathione that generates nitric oxide / M. Balazy, P.M Kaminski, K. Mao et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273 (48). – P. 32009-32015.

327. Novel phosphorylations of IKK $\gamma$ /NEMO / S.H. Lee, Z. Toth, L.Y. Wong et al. // *MBio.* – 2012. – Vol. 3 (6). – P. e00411-e00412.

328. Novel role of 4-hydroxy-2-nonenal in AIFm2-mediated mitochondrial stress signaling / S. Miriyala, C. Thippakorn, L. Chaiswing et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2016. – Vol. 91. – P. 68-80.

329. Nrf2 amplifies oxidative stress via induction of Klf9 / S.N. Zucker, E.E. Fink, A. Bagati et al. // *Mol. Cell.* – 2014. – Vol. 53 (6). – P. 916-928.

330. Nuclear redox signaling / M. Lukosz, S. Jakob, N. Büchner et al. // *Antioxid. Redox Signal.* – 2010. – Vol. 12 (6). – P. 713-742.

331. O'Donnell, M.A. Chronicles of a death foretold: dual sequential cell death checkpoints in TNF signaling / M.A. O'Donnell, A.T. Ting // *Cell Cycle.* – 2010. – Vol. 9 (6). – P. 1065-1071.

332. Oncogenes and inflammation rewire host energy metabolism in the tumor microenvironment: RAS and NF $\kappa$ B target stromal MCT4 / U.E. Martinez-Outschoorn, J.M. Curry, Y.H. Ko et al. // *Cell Cycle.* – 2013. – Vol. 12 (16). – P. 2580-2597.

333. Orrenius, S. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death / S. Orrenius, V. Gogvadze, B. Zhivotovsky // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2015. – Vol. 460 (1). – P. 72-81.

334. O'Sullivan, T.E. Natural killer cell memory / T.E. O'Sullivan, J.C. Sun, L.L. Lanier // *Immunity.* – 2015. – Vol. 43 (4). – P. 634-645.

335. Oxidative profile of tonsil infection. Study of antioxidant enzymes in tonsil and blood / F.J. Garcia Callejo, M.H. Orts Alborch, M.M. Velert Vila et al. // *Acta Otorrinolaringol Esp.* – 2002. – Vol. 53 (6). – P. 398-404.

336. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis / K. Sinha, J. Das, P.B. Pal, P.C. Sil // *Arch Toxicol.* – 2013. – Vol. 87 (7). – P. 1157-1180.

337. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes / P.A. Grimsrud, H. Xie, T.J. Griffin, D.A. Bernlohr // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283 (32). – P. 21837-21841.

338. Oxidative stress in oncohematologic diseases: an update / S. Imbesi, C. Musolino, A. Allegra et al. // *Expert Rev. Hematol.* – 2013. – Vol. 6 (3). – P. 317-325.

339. Oxidative stress-mediated antiproliferative effects of furan-containing sulfur flavors in human leukemia Jurkat cells / G.L. Zhang, Y. Liang, J.Y. Zhu et al. // *Food Chem.* – 2015. – Vol. 180. – P. 1-8.

340. p53 protein regulates Hsp90 ATPase activity and thereby Wnt signaling by modulating Aha1 expression / S. Okayama, L. Kopelovich, G. Balmus et al. // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289 (10). – P. 6513-6525.

341. Padmini, E. Heat-shock protein 70 modulates apoptosis signal-regulating kinase 1 in stressed hepatocytes of *Mugil cephalus* / E. Padmini, J. Tharani // *Fish Physiol. Biochem.* – 2014. – Vol. 40 (5). – P. 1573-1585.

342. Pan, S. Glutathiolation regulates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced caspase-3 cleavage and apoptosis: key role for glutaredoxin in the death pathway / S. Pan, B.C. Berk // *Circ Res.* – 2007. – Vol. 100 (2). – P. 213-219.

343. Park, B. JNK1 – mediated phosphorylation of Smac/DIABLO at the serine 6 residue is functionally linked to its mitochondrial release during TNF- $\alpha$ -induced apoptosis of HeLa cells / B. Park // *Mol. Med. Rep.* – 2014. – Vol. 10 (6). – P. 3205-3210.

344. Pastore, A. S-glutathionylation signaling in cell biology: progress and prospects / A. Pastore, F. Piemonte // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2012. – Vol. 46 (5). – P. 279-292.

345. Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications / N. Zarkovic, A. Cipak, M. Jaganjac et al. // *J. Proteomics.* – 2013. – Vol. 92. – P. 239-247.

346. Pegg, A.E. Toxicity of polyamines and their metabolic products /

A.E. Pegg // Chem. Res. Toxicol. – 2013. – Vol. 26 (12). – P. 1782-1800.

347. Peptides derived from the transmembrane domain of Bcl-2 proteins as potential mitochondrial priming tools / V. Andreu-Fernández, A. Genoves, T.H. Lee et al. // ACS Chem. Biol. – 2014. – Vol. 9 (8). – P. 1799-1811.

348. Perkins, N.D. Emerging from NF- $\kappa$ B's shadow, SUMOylated I $\kappa$ B $\alpha$  represses transcription / N.D. Perkins // Cancer Cell. – 2013. – Vol. 24 (2). – P. 139-140.

349. Peroxiredoxin 6 fails to limit phospholipid peroxidation in lung from Cftr-knockout mice subjected to oxidative challenge / S. Trudel, M. Kelly, J. Fritsch et al. // PLoS One. – 2009. – Vol. 4 (6). – P e6075.

350. Pflaum, J. p53 Family and cellular stress responses in cancer / J. Pflaum, S. Schlosser, M. Müller // Front Oncol. – 2014. – Vol. 4. – P. 285.

351. Phosphoproteomics for the masses / P.A. Grimsrud, D.L. Swaney, C.D. Wenger et al. // ACS Chem. Biol. – 2010. – Vol. 5 (1). – P. 105-119.

352. Phosphorylation and linear ubiquitin direct A20 inhibition of inflammation / I.E. Wertz, K. Newton, D. Seshasayee et al. // Nature. – 2015. – Vol. 528 (7582). – P. 370-375.

353. Photobleaching of fluorescein as a probe for oxidative stress in single cells / M. Platkov, R. Tirosh, M. Kaufman et al. // J. Photochem. Photobiol. B. – 2014. – Vol. 140. – P. 306-314.

354. Physiological effect and therapeutic application of alpha lipoic acid / S. Park, U. Karunakaran, N.H. Jeoung et al. // Curr. Med. Chem. – 2014. – Vol. 21 (32). – P. 3636-3645.

355. Pick, E. Cell-free NADPH oxidase activation assays: «*in vitro* veritas» / E. Pick // Methods Mol. Biol. – 2014. – Vol. 1124. – P. 339-403.

356. Pickering, A.M. A simple fluorescence labeling method for studies of protein oxidation, protein modification, and proteolysis / A.M. Pickering, K.J. Davies // Free Radic. Biol. Med. – 2012. – Vol. 52 (2). – P. 239-246.

357. Pisoschi, A.M. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative

stress: a review / A.M. Pisoschi, A. Pop // *Eur. J. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 97. – P. 55-74.

358. Popko, K. The role of natural killer cells in pathogenesis of autoimmune diseases / K. Popko, E. Górska // *Cent. Eur. J. Immunol.* – 2016. – Vol. 40 (4). – P. 470-476.

359. Popov, D. Protein S-glutathionylation: from current basics to targeted modifications / D. Popov // *Arch. Physiol. Biochem.* – 2014. – Vol. 120 (4). – P. 123-130.

360. Potentiation of apoptosis by low dose stress stimuli in cells expressing activated MEK kinase 1 / C. Widmann, N.L. Johnson, A.M. Gardner et al. // *Oncogene.* – 1997. – Vol. 15 (20). – P. 2439-2447.

361. Powis, G. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer / G. Powis, D. Mustacich, A. Coon // *Free Radic. Biol.* – 2000. – Vol. 29 (3-4). – P. 312-322.

362. Protein carbonylation and heat shock proteins in human skeletal muscle: relationships to age and sarcopenia / M.R. Beltran Valls, D.J. Wilkinson, M.V. Narici et al. // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* – 2015. – Vol. 70 (2). – P. 174-181.

363. Protein damage, repair and proteolysis / N. Chondrogianni, I. Petropoulos, S. Grimm et al. // *Mol. Aspects Med.* – 2014. – Vol. 35. – P. 1-71.

364. Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress / R.C. Cumming, N.L. Andon, P.A. Haynes et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279 (21). – P. 21749-21758.

365. Protein oxidation: identification and utilisation of molecular markers to differentiate singlet oxygen and hydroxyl radical-mediated oxidative pathways / J.E. Plowman, S. Deb-Choudhury, A.J. Grosvenor, J.M. Dyer // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2013. – Vol. 12 (11). – P. 1960-1967.

366. Protein tyrosine nitration and thiol oxidation by peroxynitrite-strategies to prevent these oxidative modifications / A. Daiber, S. Daub, M. Bachschmid et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14 (4). – P. 7542-7570.

367. Proteomic identification and quantification of S-glutathionylation in mouse macrophages using resin-assisted enrichment and isobaric labeling / D. Su, M.J. Gaffrey, J. Guo et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2014. – Vol. 67. – P. 460-470.

368. Proteomics of cell-cell interactions in health and disease / R.S. Lindoso, V. Sandim, F. Collino et al. // *Proteomics.* – 2016. – Vol. 16 (2). – P. 328-344.

369. Putative role of SUMOylation in controlling the activity of deubiquitinating enzymes in cancer / K.C. Masoumi, G. Marfany, Y. Wu, R. Massoumi // *Future Oncol.* – 2016. – Vol. 12 (4). – P. 565-574.

370. Ranaweera, R.S. Auto-ubiquitination of Mdm2 enhances its substrate ubiquitin ligase activity / R.S. Ranaweera, X. Yang // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288 (26). – P. 18939-18946.

371. Raturi, A. Redox dependence of endoplasmic reticulum (ER) Ca<sup>2+</sup> signaling / A. Raturi, C. Ortiz-Sandoval, T. Simmen // *Histol. Histopathol.* – 2014. – Vol. 29 (5). – P. 543-552.

372. Reactive carbonyls are a major Th2-inducing damage-associated molecular pattern generated by oxidative stress / A.E. Moghaddam, K.H. Gartlan, L. Kong, Q.J. Sattentau // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 187 (4). – P. 1626-1633.

373. Reactive oxygen species as mediator of tumor radiosensitivity / R. Dayal, A. Singh, A. Pandey, K.P. Mishra // *J. Cancer Res. Ther.* – 2014. – Vol. 10 (4). – P. 811-818.

374. Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via cross-talk between PI3-K/PKB and JNK signaling pathways / S.L. Liu, X. Lin, D.Y. Shi et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – Vol. 406 (2). – P. 173-182.

375. Reactive oxygen species, especially O<sup>2+\*</sup> in cancer mechanisms / I. Engler, C. Atzmüller, V. Donic, F. Steinhäusler // *J. Exp. Ther. Oncol.* – 2009. – Vol. 8 (2). – P. 157-165.

376. Redox amplification of apoptosis by caspase-dependent cleavage of glutaredoxin 1 and S-glutathionylation of Fas / V. Anathy, S.W. Aesif, A.S. Guala et al. // *J. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 184 (2). – P. 241-252.

377. Redox control of cell death / S. Ueda, H. Masutani, H. Nakamura et al. // *Antioxid. Redox Signal.* – 2002. – Vol. 4 (3). – P. 405-414.
378. Redox control of cellular function by thioredoxin; a new therapeutic direction in host defence / Y. Nishinaka, H. Nakamura, H. Masutani, J. Yodoi // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 2001. – Vol. 49 (4). – P. 285–292.
379. Redox control of protein degradation / M. Pajares, N. Jiménez-Moreno, I.H. Dias et al. // *Redox Biol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 409-420.
380. Redox potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif / W.H. Watson, J. Pohl, W.R. Montfort et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278 (35). – P. 33408-33415.
381. Redox regulation of surface protein thiols: identification of integrin-4 as a molecular target by using redox proteomics / T. Laragione, V. Bonetto, F. Casoni et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100 (25). – P. 14737-14741.
382. Redox regulation of T-cell function: from molecular mechanisms to significance in human health and disease / P. Kesarwani, A.K. Murali, A.A. Al-Khami, S. Mehrotra // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 18 (12). – P. 1497-1534.
383. Redox regulatory mechanism of transnitrosylation by thioredoxin / C. Wu, T. Liu, W. Chen et al. // *Mol. Cell Proteomics.* – 2010. – Vol. 9 (10). – P. 2262-2275.
384. Redox state of p63 and p73 core domains regulates sequence-specific DNA binding / V. Tichý, L. Navrátilová, M. Adámik et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – Vol. 433 (4). – P. 445-449.
385. Redox-dependent regulation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump: new twists to an old target for treatment of heart failure / C.C. Liu, N.A. Fry, E.J. Hamilton et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2013. – Vol. 61. – P. 94-101.
386. Redox-sensitive cysteines bridge p300/CBP-mediated acetylation and FoxO4 activity / T.B. Dansen, L.M. Smits, M.H. van Triest et al. // *Nat. Chem. Biol.* – 2009. – Vol. 5 (9). – P. 664-672.
387. Reduction of protein radicals by GSH and ascorbate: potential biological

significance / J.M. Gebicki, T. Nauser, A. Domazou et al. // *Amino Acids*. – 2010. – Vol. 39 (5). – P. 1131-1137.

388. Reed, J.C. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects / J.C. Reed // *Blood*. – 2008. – Vol. 111 (7). – P. 3322-3330.

389. Refaat, A. TRAIL combinations: the new 'trail' for cancer therapy / A. Refaat, A. Abd-rabou, A. Reda // *Oncol. Lett.* – 2014. – Vol. 7 (5). – P. 1327-1332.

390. Regulation of apoptosis by heat shock proteins / D. Kennedy, R. Jäger, D.D. Mosser, A. Samali // *IUBMB Life*. – 2014. – Vol. 66 (5). – P. 327-338.

391. Regulation of Bax/mitochondria interaction by AKT / L. Simonyan, T.T. Renault, M.J. da Costa Novais et al. // *FEBS Lett.* – 2016. – Vol. 590 (1). – P. 13-21.

392. Regulation of cell death receptor S-nitrosylation and apoptotic signaling by sorafenib in hepatoblastoma cells / A. Rodríguez-Hernández, E. Navarro-Villarán, R. González et al. // *Redox Biol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 174-182.

393. Regulation of I(kappa)B kinase complex by phosphorylation of (gamma)-binding domain of I(kappa)B kinase (beta) by polo-like kinase 1 / T. Higashimoto, N. Chan, Y.K. Lee, E. Zandi // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283 (51). – P. 35354-35367.

394. Regulation of lifespan by the mitochondrial electron transport chain: reactive oxygen species-dependent and reactive oxygen species-independent mechanisms / F. Scialo, V. Mallikarjun, R. Stefanatos, A. Sanz // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 19 (16). – P. 1953-1969.

395. Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin / G. Ceballos-Cancino, M. Espinosa, V. Maldonado, J. Melendez-Zajgla // *Oncogene*. – 2007. – Vol. 26 (54). – P. 7569-7575.

396. Regulatory and effector T-cells are differentially modulated by dexamethasone / J. Pandolfi, P. Baz, P. Fernández et al. // *Clin. Immunol.* – 2013. – Vol. 149 (3). – P. 400-410.

397. Resolution of oxidative stress by thioredoxin reductase: cysteine versus

selenocysteine / B. Cunniff, G.W. Snider, N. Fredette et al. // *Redox biology*. – 2014. – Vol. 2. – P. 475-484.

398. Reth, M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation / M. Reth // *Nat. Immunol.* – 2002. – Vol. 3 (12). – P. 1129-1134.

399. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction: description of a RIN-based algorithm for accurate data normalization / A. Ho-Pun-Cheung, C. Bascoul-Mollevi, E. Assenat et al. // *BMC Mol. Biol.* – 2009. – P. 1-10.

400. RHAMM/ERK interaction induces proliferative activities of cementifying fibroma cells through a mechanism based on the CD44-EGFR / H. Hatano, H. Shigeishi, Y. Kudo et al. // *Lab. Invest.* – 2011. – Vol. 91 (3). – P. 379-391.

401. Rho kinase mediates porphyromonas gingivalis outer membrane vesicle-induced suppression of endothelial nitric oxide synthase through ERK1/2 and p38 MAPK / Y. Jia, B. Guo, W. Yang et al. // *Arch. Oral Biol.* – 2014. – Vol. 60 (3). – P. 488-495.

402. Richter, K. The heat shock response: life on the verge of death / K. Richter, M. Haslbeck, J. Buchner // *Mol. Cell.* – 2010. – Vol. 40 (2). – P. 253-266.

403. RNF125 is a ubiquitin-protein ligase that promotes p53 degradation / L. Yang, B. Zhou, X. Li et al. // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2015. – Vol. 35 (1). – P. 237-245.

404. Role of advanced glycation end products in cellular signaling / C. Ott, K. Jacobs, E. Haucke et al. // *Redox Biol.* – 2014. – Vol. 2. – P. 411-429.

405. Role of catalase in monocytic differentiation of U937 cells by TPA: hydrogen peroxide as a second messenger / T. Yamamoto, N. Sakaguchi, M. Hachiya et al. // *Leukemia*. – 2009. – Vol. 23 (4). – P. 761-769.

406. Role of ubiquitin ligases and the proteasome in oncogenesis: novel targets for anticancer therapies / L.N. Micel, J.J. Tentler, P.G. Smith, G.S. Eckhardt // *J. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 31 (9). – P. 1231-1238.

407. Safa, A.R. c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator / A.R. Safa // *Exp.*

Oncol. – 2012. – Vol. 34 (3). – P. 176-184.

408. Sahaf, B. Lymphocyte surface thiol levels / B. Sahaf, K. Heydari, L.A. Herzenberg // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100 (7). – P. 4001-4005.

409. Sahu, S.C. Role of oxygen free radicals in the molecular mechanisms of carcinogenesis: a review / S.C. Sahu // Environ. Carcin. Exotoxicol. Rev. – 1991. – Vol. 9. – P. 83-112.

410. Saibil, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation / H. Saibil // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2013. – Vol. 14 (10). – P. 630-642.

411. Saibil, H.R. Chaperone machines in action / H.R. Saibil // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2008. – Vol. 18 (1). – P. 35-42.

412. Salvesen, G.S. Functions of caspase 8: the identified and the mysterious / G.S. Salvesen, C.M. Walsh // Semin. Immunol. – 2014. – Vol. 26 (3). – P. 246-252.

413. Sandhu, S.K. Mitochondrial electron transport chain complexes in aging rat brain and lymphocytes / S.K. Sandhu, G. Kaur // Biogerontology. – 2003. – Vol. 4 (1). – P. 19-29.

414. Sanman, L.E. Activity-based profiling of proteases / L.E. Sanman, M. Bogyo // Annu. Rev. Biochem. – 2014. – Vol. 83. – P. 249-273.

415. Saraiva, R.M. Nitric oxide signaling in the cardiovascular system: implications for heart failure / R.M. Saraiva, J.M. Hare // Curr. Opin. Cardiol. – 2006. – Vol. 21 (3). – P. 221-228.

416. Schmittgen, T.D. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method / T.D. Schmittgen, K.J. Livak // Nat. Protoc. – 2008. – Vol. 3 (6). – P. 1101-1108.

417. Schöneich, C. Thiyl radicals and induction of protein degradation / C. Schöneich // Free Radic. Res. – 2016. – Vol. 50 (2). – P. 143-149.

418. Scotcher, J. Unequivocal determination of site-specific protein disulfide bond reduction potentials by top-down FTICR MS: characterization of the N- and C-terminal redox-active sites in human thioredoxin 1 / J. Scotcher, B.J. Bythell,

A.G. Marshall // *Anal. Chem.* – 2013. – Vol. 85 (19). – P. 9164-9172.

419. Selective glucocorticoid receptor translational isoforms reveal glucocorticoid-induced apoptotic transcriptomes / I. Wu, S.C. Shin, Y. Cao et al. // *Cell Death Dis.* – 2013. – Vol. 4. – P. e453.

420. Sengupta, R. The role of thioredoxin in the regulation of cellular processes by S-nitrosylation / R. Sengupta, A. Holmgren // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1820 (6). – P. 689-700.

421. Sepsis, oxidative stress, and hypoxia: are there clues to better treatment? / D. Bar-Or, M.M. Carrick, C.W. Mains et al. // *Redox Rep.* – 2015. – Vol. 20 (5). – P. 193-197.

422. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis / M. Castedo, T. Hirsch, S.A. Susin et al. // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 157 (2). – P. 512-521.

423. Shan, H. Research progress in linear ubiquitin modification / H. Shan, Z. Lingqiang // *Yi Chuan.* – 2015. – Vol. 37 (9). – P. 911-917.

424. Shelton, M.D. Glutaredoxin: role in reversible protein s-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation / M.D. Shelton, P.B. Chock, J.J. Mieyal // *Antioxid. Redox Signal.* – 2005. – Vol. 7 (3-4). – P. 348-366.

425. Sjakste, N. Role of the ubiquitin-proteasome protein degradation pathway in carcinogenesis, tumor progression and susceptibility to tumor treatment / N. Sjakste, T. Sjakste, U. Vikmanis // *Exp. Oncol.* – 2002. – Vol. 24. – P. 243-248.

426. Skulachev, V.P. Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: «it is better to die than to be wrong» / V.P. Skulachev // *IUBMB Life.* – 2000. – Vol. 49 (5). – P. 365-373.

427. Smalle, J. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway / J. Smalle, R.D. Vierstra // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2004. – Vol. 55. – P. 555-590.

428. Small-molecule IAP antagonists sensitize cancer cells to TRAIL-induced apoptosis: roles of XIAP and cIAPs / D. Finlay, M. Vamos, M. González-López et al. //

Mol. Cancer Ther. – 2014. – Vol. 13 (1). – P. 5-15.

429. S-Nitrosylation in TNF superfamily signaling pathway: implication in cancer / S. Plenchette, S. Romagny, V. Laurens, A. Bettaieb // Redox Biol. – 2015. – N 6. – P. 507-515.

430. Sohal, R.S. Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging / R.S. Sohal, A.M. Dubey // Free Radic. Biol. Med. – 1994. – Vol. 16 (5). – P. 621-626.

431. Soleimanpour, E. Survivin as a potential target for cancer therapy / E. Soleimanpour, E. Babaei // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2015. – Vol. 16 (15). – P. 6187-6191.

432. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins / M. Haslbeck, T. Franzmann, D. Weinfurtner, J. Buchner // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2005. – Vol. 12 (10). – P. 842-846.

433. Son, A. Thioredoxin / A. Son, J. Yodoi, H. Nakamura // Nippon Rinsho. – 2004. – Vol. 62, Suppl. 11. – P. 537-540.

434. Söti, C. Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease / C. Söti, P. Csermely // J. Biosci. – 2007. – Vol. 32 (3). – P. 511-515.

435. Specifically targeted modification of human aldose reductase by physiological disulfides / M. Cappiello, M. Voltarelli, I. Cecconi et al. // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271 (52). – P. 33539-33544.

436. Spickett, C.M. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: advances in chemistry and analysis / C.M. Spickett // Redox Biol. – 2013. – Vol. 1. – P. 145-152.

437. Stadtman, E.R. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins / E.R. Stadtman, R.L. Levine // Amino Acids. – 2003. – Vol. 25 (3-4). – P. 207-218.

438. Stadtman, E.R. Protein oxidation / E.R. Stadtman, R.L. Levine // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2000. – Vol. 899. – P. 191-208.

439. Stadtman, E.R. Protein oxidation and aging / E.R. Stadtman // Free

Radic. Res. – 2006. – Vol. 40 (12). – P. 1250-1258.

440. Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging and age-related diseases / E.R. Stadtman // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2001. – Vol. 928. – P. 22-38.

441. Stennicke, H.R. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8 / H.R. Stennicke, G.S. Salvesen // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272 (41). – P. 25719-25723.

442. Stetler, R.A. HSP27: mechanisms of cellular protection against neuronal injury / R.A. Stetler // Curr. Mol. Med. – 2009. – Vol. 9 (7). – P. 863-872.

443. Structural disorder and its role in proteasomal degradation / A. Aufderheide, P. Unverdorben, W. Baumeister, F. Förster // FEBS Lett. – 2015. – Vol. 589 (19), Pt. A. – P. 2552-2560.

444. Sun, X.X. Deubiquitinating c-Myc: USP36 steps up in the nucleolus / X.X. Sun, R.C. Sears, M.S. Dai // Cell Cycle. – 2015. – Vol. 14 (24). – P. 3786-3793.

445. Superoxide enhances  $\text{Ca}^{2+}$  entry through L-type channels in the renal afferent arteriole / P.A. Vogel, X. Yang, N.G. Moss, W.J. Arendshorst // Hypertension. – 2015. – Vol. 66 (2). – P. 374-381.

446. T cell activation is driven by an ADP-dependent glucokinase linking enhanced glycolysis with mitochondrial reactive oxygen species generation / M.M. Kamiński, S.W. Sauer, M. Kamiński et al. // Cell Rep. – 2012. – Vol. 2 (5). – P. 1300-1315.

447. Tamura, T. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties and thioredoxin reductase activity / T. Tamura, T.C. Stadtman // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol. 93 (3). – P. 1006-1011.

448. Target cell-derived superoxide anions cause efficiency and selectivity of intercellular induction of apoptosis / M. Herdener, S. Heigold, M. Saran, G. Bauer // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – Vol. 29 (12). – P. 1260-1271.

449. Target the more druggable protein states in a highly dynamic protein-protein interaction system / Z. Guo, A. Thorarensen, J. Che, L. Xing // J. Chem. Inf. Model. – 2016. – Vol. 56 (1). – P. 35-45.

450. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling / Z.S. Galis, C. Johnson, D. Godin et al. // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 91 (9). – P. 852-859.

451. Targeting FoxM1 transcription factor in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line / Ö. Tüfekçi, M.K. Yandım, H. Ören et al. // *Leuk. Res.* – 2015. – Vol. 39 (3). – P. 342-347.

452. Tau phosphorylation, molecular chaperones, and ubiquitin E3 ligase: clinical relevance in Alzheimer's disease / P. Kumar, N.K. Jha, S.K. Jha et al. // *J. Alzheimers Dis.* – 2015. – Vol. 43 (2). – P. 341-361.

453. Tennyson, A.G. Generation, translocation, and action of nitric oxide in living systems / A.G. Tennyson, S.J. Lippard // *Chem. Biol.* – 2011. – Vol. 18 (10). – P. 1211-1220.

454. TGF- $\beta$  induces degradation of PTHrP through ubiquitin-proteasome system in hepatocellular carcinoma / H. Li, G. He, H. Yao et al. // *J. Cancer.* – 2015. – Vol. 6 (6). – P. 511-518.

455. Thannickal, V.J. Reactive oxygen species in cell signaling / V.J. Thannickal, B.L. Fanburg // *J. Physiol.* – 2000. – Vol. 279 (6). – P. L1005-L1028.

456. The cellular and molecular basis of translational immunometabolism / G.D. Norata, G. Caligiuri, T. Chavakis et al. // *Immunity.* – 2015. – Vol. 43 (3). – P. 421-434.

457. The effects of nitroxyl (HNO) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism and possible mechanisms of HNO signaling / M.I. Jackson, H.F. Fields, T.S. Lujan et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2013. – Vol. 538 (2). – P. 120-129.

458. The nucleolar ubiquitin-specific protease USP36 deubiquitinates and stabilizes c-Myc / X.X. Sun, X. He, L. Yin et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2015. – Vol. 112 (12). – P. 3734-3739.

459. The redox biology network in cancer pathophysiology and herapeutics / G. Manda, G. Isvoranu, M.V. Comanescu et al. // *Redox Biol.* – 2015. – Vol. 5. – P. 347-357.

460. The role and regulation of apoptosis in sepsis / D.E. Wesche-Soldato, J.L. Lomas-Neira, M. Perl et al. // *J. Endotoxin Res.* – 2005. – Vol. 11 (6). – P. 375-382.
461. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer / M.E. Peter, A. Hadji, A.E. Murmann et al. // *Cell Death Differ.* – 2015. – Vol. 22 (4). – P. 549-559.
462. The role of heat shock proteins in cancer / G.D. Lianos, G.A. Alexiou, A. Mangano et al. // *Cancer Lett.* – 2015. – Vol. 360 (2). – P. 114-118.
463. The role of heat stress on the age related protein carbonylation / P. Bozaykut, E. Sozen, E. Kaga et al. // *J. Proteomics.* – 2013. – Vol. 89. – P. 238-254.
464. The ubiquitin system in immune regulation / Y. Park, H.S. Jin, D. Aki et al. // *Adv. Immunol.* – 2014 – Vol. 124. – P. 17-66.
465. The ubiquitin-proteasome pathway an emerging anticancer strategy for therapeutics: a patent analysis / C.K. Jain, S. Arora, A. Khanna et al. // *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* – 2015. – Vol. 10 (2). – P. 201-213.
466. The ubiquitin-proteasome system / D. Nandi, P. Tahiliani, A. Kumar, D. Chandu // *J. Biosci.* – 2006. – Vol. 31 (1). – P. 137-155.
467. The update on transcriptional regulation of autophagy in normal and pathologic cells: a novel therapeutic target / Z. Zhang, M. Guo, S. Zhao et al. // *Biomed. Pharmacother.* – 2015. – Vol. 74. – P. 17-29.
468. Therapeutic effect of recombinant human catalase on H1N1 influenza-induced pneumonia in mice / X.L. Shi, Z.H. Shi, H. Huang et al. // *Inflammation.* – 2010. – Vol. 33 (3). – P. 166-172.
469. Thioredoxin 1 and glutaredoxin 2 contribute to maintain the phenotype and integrity of neurons following perinatal asphyxia / J.I. Romero, E.M. Hanschmann, M. Gellert et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – Vol. 1850 (6). – P. 1274-1285.
470. Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells / D.A. Mitchell, S.U. Morton, N.B. Fernhoff, M.A. Marletta // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104 (28). – P. 11609–11614.
471. Thioredoxin/thioredoxin reductase system involvement in cerebellar

granule cell apoptosis / A. Bobba, E. Casalino, V.A. Petragallo, A. Atlante // *Apoptosis*. – 2014. – Vol. 19 (10). – P. 1497-1508.

472. Thioredoxin-related protein of 14 kDa is an efficient L-cystine reductase and S-denitrosylase / I. Pader, R. Sengupta, M. Cebula et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2014. – V. 111 (19). – P. 6964-6969.

473. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling / E.M. Hanschmann, J.R. Godoy, C. Berndt et al. // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 19 (13). – P. 1539-1605.

474. Thom, S.R. Oxygen-dependent antagonism of lipid peroxidation / S.R. Thom, M.E. Elbuken // *Free Radic. Biol. Med.* – 1991. – Vol. 10 (6). – P. 413-426.

475. Thomas, J.A. Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls / J.A. Thomas, R.J. Mallis // *Exp. Gerontol.* – 2001. – Vol. 36 (9). – P. 1519-1526.

476. Tiazhelova, V.G. The role of the interaction between signaling protein domains and of the complexes of signaling proteins in apoptosis initiation / V.G. Tiazhelova // *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* – 2007. – Vol. 2. – P. 133-144.

477. Tome, M.E. Hydrogen peroxide signaling is required for glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoma cells / M.E. Tome, M.C. Jaramillo, M.E. Briehl // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 51 (11). – P. 2048-2059.

478. Toward an understanding of mechanism of aging-induced oxidative stress in human mesenchymal stem cells / L. Benameur, N. Charif, Y. Li et al. // *Biomed. Mater. Eng.* – 2015. – Vol. 25, Suppl. 1. – P. 41-46.

479. TRAILing death in cancer / G. Mellier, S. Huang, K. Shenoy, S. Pervaiz // *Mol. Aspects Med.* – 2010. – Vol. 31 (1). – P. 93-112.

480. Treatment of colon cancer cells using the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide system induces apoptosis, modulation of the proteome, and Hsp90beta phosphorylation / L. Negroni, M. Samson, J.M. Guignonis et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2007. – Vol. 6 (10). – P. 2747-2756.

481. Tumor suppressive functions of ceramide: evidence and mechanisms /

S. Galadari, A. Rahman, S. Pallichankandy, F. Thayyullathil // *Apoptosis*. – 2015. – Vol. 20 (5). – P. 689-711.

482. Tyrosine isomers and hormonal signaling: a possible role for the hydroxyl free radical in insulin resistance / G.A. Molnár, E.Z. Mikolás, I.A. Szijártó et al. // *World J. Diabetes*. – 2015. – Vol. 6 (3). – P. 500-507.

483. Ubiquitin proteasome system stress underlies synergistic killing of ovarian cancer cells by bortezomib and a novel HDAC6 inhibitor / M. Bazzaro, Z. Lin, A. Santillan et al. // *Clin. Cancer Res*. – 2008. – Vol. 14 (22). – P. 7340-7347.

484. Ubiquitin-conjugating enzyme E2C: a potential cancer biomarker / C. Xie, C. Powell, M. Yao et al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. – 2014. – Vol. 47. – P. 113-117.

485. Ubiquitin-independent degradation of antiapoptotic MCL-1 / D.P. Stewart, B. Koss, M. Bathina et al. // *Mol. Cell. Biol*. – 2010. – Vol. 30 (12). – P. 3099-3110.

486. Udensi, U.K. Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment / U.K. Udensi, P.B. Tchounwou // *J. Exp. Clin. Cancer Res*. – 2014. – Vol. 33. – P. 106.

487. Ullrich, V. Redox signaling: bioinorganic chemistry at its best / V. Ullrich, R. Kissner // *J. Inorg. Biochem*. – 2006. – Vol. 100 (12). – P. 2079-2086.

488. Ullrich, V. Sensing hypoxia by mitochondria: a unifying hypothesis involving S-nitrosation / V. Ullrich, S. Schildknecht // *Antioxid. Redox Signal*. – 2014. – Vol. 20 (2). – P. 325-338.

489. Ulmer, A.J. Discontinuous density gradient separation in human mononuclear leucocytes using percoll as gradient medium / A.J. Ulmer, H.D. Flad // *J. Immunol. Methods*. – 1979. – Vol. 30 (1). – P. 1-10.

490. Underlying mechanisms of cAMP- and glucocorticoid-mediated inhibition of FasL expression in activation-induced cell death / A.C. Liberman, D. Refojo, M. Antunica-Noguerol et al. // *Mol. Immunol*. – 2012. – Vol. 50 (4). – P. 220-235.

491. Valko, M. Metals, toxicity and oxidative stress / M. Valko, H. Morris, M.T. Cronin // *Curr. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 12 (10). – P. 1161-1208.
492. Varfolomeev, E. Roles of c-IAP proteins in TNF receptor family activation of NF- $\kappa$ B signaling / E. Varfolomeev, T. Goncharov, D. Vucic // *Methods Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 1280. – P. 269-282.
493. Vizer, G. The role of alimentary oxidants and antioxidants in carcinogenesis / G. Vizer, J. Fehér // *Orv. Hetil.* – 2001. – Vol. 142 (30). – P. 1605-1609.
494. Vorinostat and sorafenib increase CD95 activation in gastrointestinal tumor cells through a Ca(2+)-de novo ceramide-PP2A-reactive oxygen species-dependent signaling pathway / M.A. Park, C. Mitchell, G. Zhang et al. // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70 (15). – P. 6313-6324.
495. Vriend, J. Melatonin, bone regulation and the ubiquitin-proteasome connection: a review / J. Vriend, R.J. Reiter // *Life Sci.* – 2016. – Vol. 145. – P. 152-160.
496. Wang, J.Y. Nitric oxide plays a dual role in the oxidative injury of cultured rat microglia but not astroglia / J.Y. Wang, C.T. Lee, J.Y. Wang // *Neuroscience.* – 2014. – Vol. 281. – P. 164-177.
497. Wang, R.E. Targeting heat shock proteins 70/90 and proteasome for cancer therapy / R.E. Wang // *Curr. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 18 (27). – P. 4250-4264.
498. Wang, Y. Different signaling pathways stimulate a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17) in neutrophils during apoptosis and activation / Y. Wang, J.D. Robertson, B. Walcheck // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286 (45). – P. 38980-38988.
499. Waterman, H. Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases / H. Waterman, Y. Yarden // *FEBS letters.* – 2001. – Vol. 490 (3). – P. 142-152.
500. Wehr, N.B. Quantification of protein carbonylation / N.B. Wehr,

R.L. Levine // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 965. – P. 265-281.

501. Wilkie-Grantham, R.P. Novel phosphorylation and ubiquitination sites regulate reactive oxygen species-dependent degradation of anti-apoptotic c-FLIP protein / R.P. Wilkie-Grantham, S. Matsuzawa, J.C. Reed // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288 (18). – P. 12777-12790.

502. Winterbourn, C.C. The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells / C.C. Winterbourn // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1840 (2). – P. 730-738.

503. Witko-Sarsat, V. Advanced oxidation protein products as novel markers of oxidative stress in ischemia / V. Witko-Sarsat, M. Friedlander // *J. Neurochem.* – 2000. – Vol. 22 (6). – P. 342-350.

504. Worthington, D.J. Glutathione reductase from human erythrocytes. Catalytic properties and aggregation / D.J. Worthington, M.A. Rosemeyer // *Eur. J. Biochem.* – 1976. – Vol. 67 (1). – P. 231-238.

505. Xu, C. Regulation of Mdm2 protein stability and the p53 response by NEDD4-1 E3 ligase / C. Xu, C.D. Fan, X. Wang // *Oncogene.* – 2015. – Vol. 34 (3). – P. 281-289.

506. Yan, R. Acrolein-mediated conduction loss is partially restored by K<sup>+</sup> channel blockers / R. Yan, J.C. Page, R. Shi // *J. Neurophysiol.* – 2016. – Vol. 115 (2). – P. 701-710.

507. Yang, R. Chemical methods for protein ubiquitination / R. Yang, C.F. Liu // *Top. Curr. Chem.* – 2015. – Vol. 362. – P. 89-106.

508. Yang, Y. Protein ubiquitination in lymphoid malignancies / Y. Yang, L.M. Staudt // *Immunol. Rev.* – 2015 – Vol. 263 (1). – P. 240-256.

509. Yunbo, W. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis / W. Yunbo, F. Tingjun, Y. Miaomiao // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* – 2008. – Vol. 40 (4). – P. 278-288.

510. Zamora, R. Strecker-type degradation of phenylalanine initiated by 4-oxo-2-alkenals in comparison to that initiated by 2,4-alkadienals, 4,5-epoxy-2-alkenals,

or 4-hydroxy-2-nonenal / R. Zamora, E. Alcón, F.J. Hidalgo // *J. Agric. Food Chem.* – 2013. – Vol. 61 (43). – P. 10231-10237.

511. Zhang, Z. Selenoproteins and selenium status in bone physiology and pathology / Z. Zhang, J. Zhang, J. Xiao // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1840 (11). – P. 3246-3256.

512. Zhou, Z. Role and mechanism of heat shock protein 70 in airway hypersecretion / Z. Zhou, T. Zhang, X. Zhou et al. // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 2015. – Vol. 95 (8). – P. 581-584.

513. Zong, W.X. Mitochondria and cancer / W.X. Zong, J.D. Rabinowitz, E. White // *Mol. Cell.* – 2016. – Vol. 61 (5). – P. 667-676.