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

На правах рукописи

Орлов Дмитрий Сергеевич

РЕДОКС-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА КЛЕТОК ЛИНИИ P19 ПРИ ГИПОКСИИ

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Носарева Ольга Леонидовна

ТОМСК – 2024

Оглавление

Введение 5
Глава 1. Обзор литературы. Современные представления о роли редокс-баланса и окислительной модификации белков в нарушении регуляции апоптоза опухолевых клеток в условиях гипоксии 13
1.1 Современные представления о молекулярных механизмах реализации апоптоза 13
1.2 Опухолевый рост, гипоксия и окислительный стресс 17
1.2.1 Особенности метаболизма опухолевых клеток при гипоксии 18
1.3 Редокс-регуляция метаболизма в опухолевых клетках 25
1.4 Окислительная модификация белков – молекулярный механизм селективного управления активностью белков в норме и при опухолевом росте 32
Глава 2. Материал и методы исследования 36
2.1 Материал исследования 36
2.2 Культивирование клеток 37
2.3 Условия культивирования клеток и тесты in vitro 38
2.4 Моделирование гипоксии 39
2.5 Приготовление клеточных лизатов 40
2.6 Оценка реализации апоптоза аннексиновым тестом в опухолевых клетках линии P19 42
2.7 Оценка митохондриального мембранного потенциала в опухолевых клетках линии P19 43
2.8 Оценка количества TNF RI- и Fas-положительных опухолевых клеток линии P19 45
2.9 Оценка жизнеспособности опухолевых клеток линии P19 МТТ-тестом 45
2.10 Определение уровня продукции активных форм кислорода в опухолевых клетках линии P19 46
2.11 Оценка продукции гидроксильного радикала в опухолевых клетках линии P19 47

2.12 Определение концентрации глутатиона в опухолевых клетках линии P19.... 48
2.12.1 Измерение концентрации общего, восстановленного и окисленного глутатиона 48
2.12.2 Измерение концентрации глутатиона, связанного с SH-группами белков в опухолевых клетках линии P19 51
2.13 Определение концентрации SH-групп белков в опухолевых клетках линии P19 51
2.14 Определение активности глутатионредуктазы в опухолевых клетках линии P19 52
2.15 Определение активности глутатионпероксидазы в опухолевых клетках линии P19 52
2.16 Определение содержания карбонильных производных белков в опухолевых клетках линии P19 53
2.17 Оценка содержания ионов кальция в опухолевых клетках линии P19 54
2.18 Определение концентрации общего белка в опухолевых клетках линии P19 54
2.19 Статистическая обработка результатов 55
Глава 3. Результаты исследования 56
3.1 Параметры регуляции и реализации апоптоза, изменения состояния системы глутатиона и окислительной модификации белков в опухолевых клетках линии P19 в условиях нормоксии и гипоксии 56
3.2 Влияние редокс-модуляторов на регуляцию и реализацию апоптоза, состояние системы глутатиона, окислительную модификацию белков в опухолевых клетках линии P19 при нормоксии и гипоксии 63
Глава 4. Обсуждение результатов 87
4.1 Регуляция и реализация апоптоза, изменение состояния системы глутатиона и окислительной модификации белков в опухолевых клетках линии P19 в условиях нормоксии и гипоксии 87

4.2 Роль редокс-модуляторов в регуляции и реализации апоптоза опухолевых клеток линии P19 при нормоксии и гипоксии 96
Заключение 109
Выводы 114
Список сокращений 117
Список литературы 121

Введение

Актуальность темы исследования. Опухолевый рост является одной из центральных проблем патологии в силу неуклонной тенденции к росту числа онкологических заболеваний в России [6]. Молекулярные механизмы развития этого патологического процесса включают нарушение пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток на фоне окислительно-восстановительного дисбаланса [16, 64, 163, 168, 218, 221]. В настоящее время известно, что активные формы кислорода могут выступать не только в роли универсальных повреждающих факторов, но и модуляторов процессов, таких как рецепция, внутриклеточная сигнализация, пролиферация, апоптоз [16, 22, 67, 109, 139, 252]. Активные формы кислорода участвуют в функционировании редокс-системы клеток и способствуют окислительной модификации макромолекул [3, 181, 185, 221]. Одной из возможных причин активации выработки активных форм кислорода является низкое напряжение O_2 в клетке – конечного акцептора электронов для обеспечения функционирования ферментов дыхательной цепи митохондрий [14, 74, 90].

Существенный вклад в поддержании баланса между прооксидантами и антиоксидантами клетки вносит система глутатиона [15, 43]. Эффекты этой системы основаны на восстановительном потенциале глутатиона, который, выступая акцептором гидроксильного радикала, пероксида водорода и синглетного кислорода, существенно снижает цитотоксическое и деструктивное действие активных форм кислорода [29, 142]. Вместе с тем, восстановленный глутатион является коферментом глутатион-зависимых ферментов, которым принадлежит ведущая роль не только в обеспечении антиоксидантных процессов, но и в поддержании тиолдисульфидного равновесия [21]. Одной из важных функций глутатиона в редокс-регуляции клетки является образование дисульфидов с тиоловыми группами белков – глутатионилирование, что обеспечивает модуляцию активности SH-содержащих протеинов и изменение

направленности метаболических процессов [79, 130, 211]. Так, посредством глутатионилирования реализуется участие глутатиона в изменении экспрессии редокс-чувствительных генов, регуляции внутриклеточной сигнализации, функции ион-транспортирующих систем [41, 221, 268].

Перспективным направлением патологической физиологии и клеточной биологии является изучение молекулярных механизмов окислительной модификации протеинов и поиск молекул-кандидатов для регуляции метаболизма опухолевых клеток с целью активации их гибели.

В изучении молекулярных механизмов регуляции апоптоза опухолевых клеток особое внимание уделяется роли изменения редокс-статуса клетки в условиях гипоксии и вкладу процесса окислительной модификации белков. Исследования, посвященные изучению редокс-регуляции активности белков посредством глутатионилирования и карбонилирования, позволят вскрыть молекулярные механизмы активации апоптоза опухолевых клеток в условиях гипоксии.

Степень разработанности темы. Актуальным направлением теоретической науки являются работы по изучению механизмов запуска и регуляции апоптотической формы гибели клеток в зависимости от напряжения кислорода и формирования окислительного стресса [143]. Редокс-баланс клетки напрямую зависит от состояния системы глутатиона, ведущим компонентом которой является восстановленный глутатион [32, 29]. Этот трипептид выступает важнейшим акцептором гидроксильного радикала, обладающего мощным цитотоксическим эффектом [15, 38]. Продукция активных форм кислорода зависит от напряжения O_2 в клетке и во многом от функционирования цепи переноса электронов, расположенной во внутренней мембране митохондрий, которые вносят значительный вклад в реализацию процесса апоптоза [159, 209, 218]. В свою очередь активность белков, регулирующих метаболизм клетки: рецепторы, компоненты сигнальных систем, ферменты (в том числе, ферменты электрон-транспортной цепи) и другие, модулируется их окислительной

модификацией и скоростью деградации [18, 78, 171, 198, 217, 221, 252]. Изменение функциональной активности компонентов рецепторного и митохондриального пути реализации апоптоза малигнизированных клеток с помощью глутатионилирования и карбонилирования является одним из перспективных подходов в молекулярной медицине [4, 18, 36, 37, 170, 252]. Несмотря на то, что в настоящее время активно ведутся исследования по определению молекулярных мишеней регуляции апоптоза опухолевых клеток при онкологических заболеваниях, редокс-зависимые механизмы реализации и регуляции клеточной гибели в условиях гипоксии требуют дальнейшего изучения, так как могут быть использованы для разработки таргетного управления клеточной гибелью малигнизированных клеток, устойчивых к химиотерапии.

Цель исследования: установить молекулярные механизмы участия окислительно-модифицированных белков и системы глутатиона в нарушении редокс-регуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19 при нормоксии и гипоксии *in vitro*.

Задачи исследования:

1. Оценить состояние системы глутатиона (восстановленный и окисленный глутатион, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза) при действии блокатора (N-этилмалиемид), протектора (1,4-дитиоэритритол) SH-групп и предшественника синтеза глутатиона (N-ацетилцистеин) в клетках линии P19 (тератокарциномы мыши C3H/He) при нормоксии и гипоксии.

2. Определить уровень окислительной модификации белков при действии блокатора (N-этилмалиемид), протектора (1,4-дитиоэритритол) SH-групп и предшественника синтеза глутатиона (N-ацетилцистеин) в клетках линии P19 (тератокарциномы мыши C3H/He) при нормоксии и гипоксии.

3. Охарактеризовать влияние редокс-модуляторов (блокатора (N-этилмалиемид), протектора (1,4-дитиоэритритол) SH-групп и предшественника синтеза глутатиона (N-ацетилцистеин)) на изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+}, модуляцию митохондриального и рецепторного путей

апоптоза в клетках линии P19 (тератокарциномы мыши C3H/He) при нормоксии и гипоксии.

4. Установить молекулярные механизмы редокс-управления апоптозом клеток линии P19 (тератокарциномы мыши C3H/He) посредством обратимой и необратимой окислительной модификации белков при нормоксии и гипоксии.

Научная новизна. Впервые получены новые знания фундаментального характера, отражающие состояние системы глутатиона и ее участие в молекулярных механизмах окислительной модификации белков опухолевых клеток линии P19 при нормоксии и гипоксии. Новыми являются данные, отражающие роль глутатионилирования и карбонилирования протеинов в редокс-зависимой реализации и регуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19, культивированных в условиях нормоксии и гипоксии.

Показано, что в условиях гипоксии в опухолевых клетках линии P19 происходила активация апоптоза преимущественно по митохондриальному пути, сопряженная с изменением редокс-статуса системы глутатиона, усилением наработки активных форм кислорода и накоплением окислительно-модифицированных протеинов. В условиях внутриклеточного редокс-модулирования при нормоксии в опухолевых клетках линии P19 проапоптотический эффект при блокировании SH-групп пептидов и белков опосредован как обратимой, так и необратимой окислительной модификацией протеинов, при восстановлении SH-групп пептидов и белков и действии предшественника синтеза глутатиона – только свободными SH-группами протеинов. При гипоксии действие N-этилмалеимида (блокатора SH-групп) в изучаемых клетках вызывало активацию апоптоза на фоне активации карбонилирования белков, а эффект N-ацетилцистеина (предшественника синтеза глутатиона) сопровождался снижением содержания белково-связанного глутатиона и карбонильных производных белков, 1,4-дитиоэритритола (протектора SH-групп) – только снижением глутатионилирования на фоне антиапоптотического эффекта.

В ходе проведенного исследования доказано, что глутатионилирование и карбонилирование белков представляют собой редокс-зависимые молекулярные механизмы, а компоненты системы глутатиона – молекулярные мишени управления апоптотической гибелью опухолевых клеток линии Р19 при нормоксии и гипоксии.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенное исследование расширяет представления о патогенезе опухолевого роста в условиях гипоксии. Установлена роль системы глутатиона и окислительной модификации белков в нарушении редокс-зависимой регуляции и реализации апоптоза опухолевых клеток линии Р19 при нормальном напряжении кислорода и гипоксии. Новые знания о механизмах редокс-регуляции клеточной гибели в условиях окислительного стресса, индуцированного низким напряжением кислорода в опухолевых клетках линии Р19, могут стать основой для разработки способов регуляции и реализации апоптотической клеточной гибели при патологиях, сопровождающихся формированием гипоксии. Полученные данные об особенностях участия системы глутатиона в окислительной модификации белков могут быть использованы для теоретических основ разработки новых технологий селективной регуляции и реализации апоптоза опухолевых клеток в условиях гипоксии.

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедр патофизиологии, биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики.

Методология и методы исследования. В исследование были использованы опухолевые клетки линии Р19 (тератокарцинома мыши С3Н/Не) (ФГБУН Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия). Исследование выполнено на кафедре биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заведующий кафедрой – д-р мед. наук, доцент Спирина Л.В.), базе научно-образовательного центра молекулярной медицины ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России

(руководитель – канд. мед. наук, доцент Шахристова Е.В.) и лаборатории биологических моделей ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (руководитель – канд. биол. наук, доцент Иванов В.В.).

Исследование было разделено на два этапа. Целью первого этапа явилось изучение особенностей реализации и регуляции апоптоза, оценка уровня сформированного окислительного стресса, особенностей реагирования компонентов системы глутатиона, окислительной модификации белков в опухолевых клетках, культивированных при нормальном напряжении кислорода и в условиях моделирования гипоксии *in vitro*.

На втором этапе исследования, для оценки участия окислительной модификации белков и компонентов системы глутатиона в механизмах нарушений регуляции и реализации апоптоза, опухолевые клетки линии P19 культивировали в присутствии блокатора SH-групп пептидов и протеинов – N-этилмалеимида, предшественника синтеза глутатиона – N-ацетилцистеина и протектора SH-групп пептидов и белков – 1,4-дитиоэритритола при нормальном напряжении кислорода и в условиях моделирования гипоксии *in vitro*.

Оценку количества клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, TNF RI-, Fas-, аннексин-положительных клеток, содержания активных форм кислорода и ионов Ca^{2+} проводили методом проточной цитометрии; активности глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, а также концентрации общего белка, гидроксильного радикала, SH-групп белков, общего, восстановленного, окисленного и белково-связанного глутатиона, карбонильных производных белков, МТТ-тест – спектрофотометрическим методом. Результаты проведенного исследования подвергали статистической обработке.

Положения, выносимые на защиту:

1. В условиях моделирования гипоксии в опухолевых клетках линии P19 (тератокарциномы мыши C3H/He) проапоптотический эффект сопряжен с развитием окислительного стресса, снижением редокс-статуса системы глутатиона и накоплением глутатионилированных и карбонилированных белков.

2. Механизмы редокс-зависимой регуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19 (тератокарциномы мыши C3H/He) в условиях моделирования гипоксии связаны с изменением обратимой и необратимой окислительной модификации белков.

3. Изменение редокс-статуса системы глутатиона при нормоксии осуществляется при участии сульфгидрильных групп белков и сопровождается проапоптотическим эффектом в опухолевых клетках линии P19 (тератокарциномы мыши C3H/He).

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением работы на достаточном экспериментальном 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 VIII Всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2015» (г. Новосибирск, 2015); IX Международной конференции «Биоантиоксидант» (г. Москва, 2015); V Съезде биохимиков России (г. Дагомыс, 2016); XX Российском онкологическом конгрессе (г. Москва, 2016); XII Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (г. Томск, 2017); XI научной конференции «Генетика человека и патология», посвященной 35-летию Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского НИМЦ (г. Томск, 2017); Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (г. Томск, 2018); Балтийском симпозиуме по иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине с международным участием (г. Калининград, 2018); VI Съезде биохимиков России (г. Дагомыс, 2019); Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой 130-

летию кафедры патофизиологии Императорского (государственного) Томского университета – Томского медицинского института – Сибирского государственного медицинского университета «Типовые патологические процессы: современные тренды в науке» (г. Томск, 2021); II Дальневосточной конференции молодых ученых «Медицина будущего» (г. Владивосток, 2023).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из них 5 статей – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации, из них 1 – цитируемая в Web of Science и 1 – цитируемая в Scopus.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 277 источников – 22 отечественных и 255 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 5 рисунками и 19 таблицами.

Личный вклад автора. Автором проведено планирование и разработка дизайна исследования, выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, отражающей современное состояние исследований по данной научной проблеме, самостоятельно выполнен весь комплекс запланированных методов, проведена статистическая обработка данных, интерпретация результатов исследования и подготовка их к публикации. Соискатель самостоятельно выполнил оформление диссертации, автореферата и иллюстративного материала.

Глава 1. Обзор литературы. Современные представления о роли редокс-баланса и окислительной модификации белков в нарушении регуляции апоптоза опухолевых клеток в условиях гипоксии

1.1 Современные представления о молекулярных механизмах реализации апоптоза

Апоптоз или программированная клеточная гибель характеризуется различными морфологическими и биохимическими изменениями, такими как – появление фосфатидилсерина на внешней стороне цитоплазматической мембраны, уменьшение размеров клетки, фрагментация ДНК, конденсация хроматина, формирование апоптотических пузырьков, активация ферментативного каскада каспаз – цистеиновых протеаз, расщепляющих молекулы белков по пептидной связи, в образовании которой принимает участие аспарагиновая кислота [31, 73, 81, 209, 227]. В основе жизненно важных процессов (нормальное обновление клеток и тканей, эмбриогенез, старение) лежит программированная клеточная гибель. Одним из ведущих патогенетических факторов развития заболеваний человека (онкологические, аутоиммунные, нейродегенеративные, заболевания сердечно-сосудистой системы и другие) является нарушение регуляции апоптоза [33, 35, 73, 120, 164, 214]. Таким образом, изучение молекулярно-генетических механизмов пролиферации и функционирования сигнальных путей, контролирующих фазы клеточного цикла и апоптотическую гибель, актуально как для теоретических, так и для практических отраслей медицины.

Программированная гибель клетки реализуется двумя основными путями: митохондриально- и рецептор-опосредованным. И в том, и в другом случае происходит активация инициаторных каспаз (каспазы 2, 8, 9 и 10), которые по механизму частичного протеолиза активируют эффекторные каспазы (каспазы 3, 6 и 7) [58, 175, 177, 261]. Последние участвуют в формировании биохимических и

морфологических изменений, приводящих клетку к апоптотической гибели [61, 62, 80, 88, 104].

Запуск апоптоза по рецептор-опосредованному пути происходит когда, так называемые, «рецепторы смерти» (TNF RI (tumor necrosis factor receptor I type – рецептор фактора некроза опухоли I типа), CD95/Fas (cluster of differentiation 95 – поверхностный кластер дифференцировки 95/апоптозный антиген 1), DR3 (death receptor – смерть-передающий рецептор), DR4, DR5), расположенные на цитоплазматической мембране клеток, связываются с соответствующими лигандами (TNF (tumor necrosis factor – фактор некроза опухоли), FasL (Fas ligand – Fas лиганд), TL1A (Tumor necrosis factor-like cytokine 1A – фактор некроза опухоли, подобный цитокину 1A), TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand – фактор некроза опухоли-зависимый апоптоз-индуцирующий лиганд)) из семейства фактора некроза опухоли (ФНО). Взаимодействие с лигандом вызывает тримеризацию рецепторов смерти с привлечением особых адаптерных белков, например, FADD (Fas-associated death domain – белок, взаимодействующий с доменом смерти рецептора Fas), и формирование комплекса DISC (death-inducing signaling complex – сигнальный комплекс, запускающий гибель клетки). Комплекс способен активировать каспазу 8. Но, и в отсутствии каспазы 8 запуск апоптоза происходит при участии каспазы 10, которая также может взаимодействовать с адаптерным белком FADD через свой домен DED (death-effector domain – домен эффектора смерти). Для рецепторов TNF RI и DR3 адаптерным белком служит TRADD (TNF RI-associated death domain – белок, взаимодействующий с доменом смерти рецептора TNF RI). Ингибиторами сигнального каскада, реализуемого при активации каспаз 8 и 10, является семейство белков, имеющих домен DED, лишенных каталитического домена, отвечающего за протеазную активность (c-FLIPL (cellular FADD-like interleukin-1β converting enzyme inhibitory protein L), c-FLIPS, c-FLIPR). В некоторых типах клеток активированная каспаза 8 активирует эффекторные каспазы 3, 6 и 7, что приводит к апоптозу. В остальных случаях каспаза 8

активирует эффекторные каспазы запуска апоптоза, усиливая апоптогенный сигнал через митохондриально-опосредованный путь, расщепляя и активируя проапоптотический белок BID (BH3-interacting domain death agonist – BH3-взаимодействующий домен смерти белка-агониста) [59, 60, 61, 88].

К активации апоптоза по митохондриально-опосредованному пути могут приводить разные стимулы, такие, например, как воздействие ионизирующего излучения, токсических веществ, недостаточное содержание ростовых факторов. Накопление повреждений в структуре молекулы ДНК также приводит к запуску апоптоза. Все эти стимулы способны вызывать изменение трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi m$) и высвобождение проапоптотических белков из митохондрии в цитоплазму [256]. Митохондриально-опосредованный путь запуска апоптоза контролируется белками из семейства Bcl-2 (белки-регуляторы апоптоза В-клеток лейкемии-2) [131, 230, 236, 246]. Среди представителей семейства можно выделить подгруппы белков на основании их строения и выполняемой функции в клетке. Так к антиапоптотическим белкам относятся Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 и A1. В проапоптотическую подгруппу входят Bax и Bak. Отдельно выделяют подсемейство белков, содержащих только BH3-домен (представители: Bad, Bim, Noxa, Puma) [110, 236, 256]. Белки, содержащие только BH3-домен способны связываться с антиапоптотическими белками семейства Bcl-2, такими как Bax и Bak, которые формируют поры во внешней мембране митохондрий [247, 269]. Пермеабилизация митохондриальной мембраны приводит к высвобождению проапоптотических белков, к которым относятся цитохром c, Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low PI – вторичный митохондриальный активатор каспаз/ прямо связывающий ингибитор апоптоз-специфических протеаз), эндонуклеаза G, AIF (apoptosis inducing factor – апоптоз-индуцирующий фактор). Цитохром c, взаимодействуя с Apaf-1 (apoptosis protease activating factor 1 – фактор активации протеаз 1) и прокаспазой 9, формирует апоптосому, необходимую для образования активной формы каспазы 9. Последняя, в свою

очередь, активирует каспазу 3. Smac/DIABLO способствует активации каспаз благодаря подавлению активности IAPs (inhibitor of apoptosis proteins – ингибитор апоптоз-специфических протеаз). Среди представителей семейства IAP наиболее подробно охарактеризованными можно считать XIAP, c-IAP1, c-IAP2 и Survivin, которые через домены BIR (Baculoviral IAP repeat domains – повторяющиеся домены IAP бакуловируса) могут подавлять активность каспаз 9, 3 и 7. Эндонуклеаза G и AIF транспортируются в ядро, где они способны вызывать фрагментацию ДНК [26, 61, 88].

Необходимо отметить, что существует связь между разными путями запуска апоптоза. Как упоминалось выше, регуляторный белок BID при расщеплении каспазой 8 переходит в свою активную форму t-BID (truncated-BID), переносится к митохондриям, способствуя высвобождению проапоптотических митохондриальных белков [88, 146].

По современным данным важным участником апоптоза является белок p53, который относится к факторам транскрипции и определяет экспрессию большого количества генов, вовлеченных в такие клеточные процессы, как детектирование повреждений ДНК, остановка клеточного цикла, репарация ДНК и апоптоз [34, 249, 265]. Белок p53 индуцирует транскрипцию значимых участников апоптоза: Puma, BID, Bax, TRAILR2 и CD95 [116]. Для выполнения своих функций стабилизированный транскрипционный фактор взаимодействует в ядре с коактиватором транскрипции p300/CBP – CREB ((cAMP response element-binding protein) binding protein – цАМФ респонсивный элемент связывающий белок). В нормальных клетках содержание p53 невелико по причине его быстрого разрушения, однако, при определенных условиях (например, повреждение ДНК, гипоксия) p53 стабилизируется и его концентрация в клетке возрастает. Стабильность p53 контролируется продуктом гена *MDM2*, относящимся к группе E3-убиквитинлигаз. Убиквитинилированный белок p53 подвергается протеасомной деградации [62, 146]. Мутации в гене белка p53 рассматриваются

как наиболее значимые генетические изменения в разных типах опухолей [224, 244, 245].

1.2 Опухолевый рост, гипоксия и окислительный стресс

Опухолевый рост сопровождается интенсификацией репликации ДНК, нарушением дифференцировки клеток, изменением метаболизма и развитием окислительного стресса (ОС) [70]. Синтез ДНК сопровождается повышенными потребностями в макроэргических соединениях, продукция которых зависит от концентрации кислорода в клетке. Интенсивная пролиферация малигнизированных клеток обеспечивается функционированием митохондрий и эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [161]. Внутриклеточная сигнализация обеспечивает взаимосвязи ЭПР и митохондрий и способна изменять регуляцию и реализацию апоптоза [84 ,155]. Опухолевые клетки при неконтролируемом росте определенное время, из-за недостаточного ангиогенеза, лишены адекватной поставки кислорода. При этом, деятельность дыхательной цепи митохондрий, приводящая к окислительному фосфорилированию АДФ с образованием АТФ, в условиях гипоксии сопровождается повышенной продукцией активных форм кислорода (АФК) в малигнизированных клетках [153, 155]. Наряду с этим, в опухолевых клетках источником АТФ выступает гликолиз. В процессе трансформации нормальных клеток в малигнизированные ведущая роль принадлежит митохондриям, продуцирующим АТФ и АФК (для редокс-сигнализации) [42, 138, 148, 254]. Внутриклеточный уровень АФК, по мнению Y. Chen и соавторов, влияет на процесс опухолевого роста. Изменение концентрации АФК существенно для функционирования клеток: низкое содержание АФК способствует пролиферации и метастазированию малигнизированных клеток, высокие концентрация АФК потенциируют цитотоксические эффекты [159]. Окислительно-восстановительный гомеостаз клеток во многом определяет опухолевую трансформацию и прогрессию [168].

Нарушение баланса продукция/утилизация АФК может являться тригерным фактором трансформации нормальных клеток в опухолевые, а также послужить причиной рецидива опухолевого роста [96, 133].

1.2.1 Особенности метаболизма опухолевых клеток при гипоксии

Гипоксия, сопряженная с высоким образованием АФК и изменением редокс-статуса клеток, может лежать в основе развития некоторых патологических процессов, в том числе и опухолевого роста [26, 167].

Пристальное внимание исследователей к изучению особенностей метаболизма опухолевых клеток в условиях гипоксии обусловлено во многом функционированием митохондрий – органелл, обеспечивающих не только энергетический метаболизм, но и внутриклеточную сигнализацию. В условиях гипоксии опухолевые клетки приобретают свойства, которые препятствуют запуску клеточной гибели, при этом получая селективные преимущества и дополнительную устойчивость к терапевтическому воздействию [12, 45, 228]. В опухолевых клетках, использующих большое количество макроэргических соединений, в условиях гипоксии при снижении интенсивности окислительного фосфорилирования, большую роль в продукции АТФ играет гликолиз [7, 8, 149]. Молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе вышеуказанных изменений, включают активацию транскрипции генов, кодирующих информацию о белках, включая факторы транскрипции: Apaf-1, HIF (hypoxia inducible factors – гипоксия-индуцибельный фактор), NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – транскрипционный ядерный фактор κB) и другие [7, 12, 159].

Напряжение кислорода до 5 % формирует в клетке гипоксию, полное отсутствие кислорода (на практике ниже 0,02 %) приводит к развитию аноксии. Недостаточность снабжения кислородом может развиваться остро (от нескольких минут до нескольких часов) и хронически (от нескольких часов до нескольких дней). Важными факторами, определяющими ответ клетки на данное воздействие,

выступают степень выраженности и продолжительность гипоксии [46, 94, 196, 228]. Исследование внутриклеточной сигнализации в условиях гипоксии представляет особый научный интерес. Одну из важных ролей в модуляции апоптотической гибели как нормальных, так и опухолевых клеток, по мнению ряда исследователей, играет нарушение внутриклеточной передачи сигнала в условиях гипоксии [82, 114, 119].

Клеточный ответ при гипоксии включает изменение активности предсуществующих белков, экспрессии генов [7, 94]. Установлено, что в ответ на низкое снабжение кислородом клеток и активацию продукции АФК, возможен запуск разных типов клеточной гибели, в том числе апоптоза [40, 48, 86].

В условиях гипоксии среди функционирующих транскрипционных факторов ведущая роль принадлежит белкам семейства HIF (HIF-1, HIF-2, HIF-3), среди которых наиболее значимым считают HIF-1 [89]. Белки семейства HIF способны связываться с определенной нуклеотидной последовательностью ДНК, называемой HREs (hypoxia-responsive elements – гипоксия-респонсивный элемент) [113, 267].

В эукариотических клетках присутствуют молекулярные механизмы, активирующиеся в ответ на гипоксию. Хорошо изученными сенсорами напряжения кислорода в клетках являются: представители семейства белков-ферментов пролилгидроксилаз (PhDs 1-3), ферменты цепи переноса электронов во внутренней мембране митохондрий, и фактор, ингибирующий HIF-1 – FIH (factor inhibiting HIF-1). Важно отметить, что при гипоксии возрастает продукция АФК в основном за счет «утечки» электронов в электрон-транспортной цепи митохондрий [157, 176]. Таким образом, ведущую роль в инициации и регуляции сигнальных каскадов отводят митохондрии, поскольку эта органелла активно продуцирует АФК [70, 111, 159]. Высокие концентрации АФК способствуют окислению ионов железа в активных центрах пролилгидроксилаз транскрипционного фактора HIF, что вызывает ингибирование каталитической активности этих ферментов. При этом N-ацетилцистеин, являясь антиоксидантом,

способен устранять эффект стабилизации структуры HIF-1α вызванной АФК [88]. Помимо этого, при снижении напряжения кислорода, пролилгидроксилазы и/или FIH могут быть вовлечены в возникновение патогенетических нарушений метаболизма клетки. Гидроксилирование остатков пролина в полипептидной цепи HIF происходит в присутствии молекулярного кислорода, используемого пролилгидроксилазами. Таким образом, клеточные компоненты: FIH, PHDs и митохондрии – характеризуются высокой чувствительностью к напряжению кислорода и участвуют в обеспечении стабилизации и активации HIF-1α [134, 267].

Модель, описывающая изменения, происходящие в клетке в ответ на снижение снабжения кислородом, предполагает, что PHDs являются сенсорами O_2. При нормоксии в структуре белка HIF-1α гидроксилированию молекулами PHDs подвергаются остатки пролина, входящие в состав домена, осуществляющего кислород-зависимую деградацию. Гидроксилированные остатки субстратов распознаются ферментом Е3-убиквитинлигазой (E3 ubiquitin ligase (pVHL, von Hippel-Lindau protein – белок фон Гиппеля-Линдау), которая выполняет ковалентную модификацию HIF-1α для его дальнейшей деградации с помощью протеасом [89, 258, 276]. Концентрация кислорода в клетке является важным фактором, оказывающим влияние на активность PHDs и FIH. При достижении содержания кислорода выше 5 % будет происходить инактивация FIH [188]. Следовательно, при гипоксии разное напряжение кислорода регулирует экспрессию некоторых генов. Это позволяет объяснить формирование разных клеточных ответов при разных уровнях гипоксии. В качестве примера: участок гена VEGF (vascular endothelial growth factor – фактор роста эндотелия сосудов) экспрессируется максимально при 2 % напряжении кислорода, в то время как при 1 % содержании O_2 отмечена наибольшая экспрессия HIF-1α [115, 240].

Согласно проведенным исследованиям, описанная выше модель не может полностью объяснить кислород-зависимую стабилизацию HIF-1α, поскольку в организме уровень кислорода снижается не так существенно при гипоксии, чтобы

полностью ингибировать FIH и PHDs [134]. Принятая в настоящее время концепция утверждает, что гипоксия приводит к возрастанию продукции АФК комплексом III цепи переноса электронов, а АФК, в свою очередь, предотвращают гидроксилирование HIF-1α [173]. Таким образом, FIH, PHDs и митохондрии выступают в роли O_2-чувствительных сенсоров, совместно регулирующих активацию HIF-1 при гипоксии [134, 157, 158, 187].

Для поддержания жизнедеятельности клеток, в том числе при гипоксии, необходимы синтез макроэргических соединений, активация ферментов гликолиза, ангиогенез. Обеспечение протекания этих процессов требует регуляции экспрессии генов, важная роль в которой принадлежит HIF-1. В условиях средней степени выраженности гипоксии генами-мишенями являются те гены, которые кодируют инсулиноподобный фактор роста 2 (insulin-like growth factor-2, IGF-2), фактор роста эндотелия сосудов VEGF, трансформирующий фактор роста α (transforming growth factor-α, TGF-α), эритропоэтин (erythropoietin, EPO), транспортер глюкозы (ГЛЮТ-1), ферменты гликолиза. Продолжительное и существенное снижение парциального давления кислорода способствует запуску процессов гибели клеток с активацией генов, кодирующих каспазу 3, p53 и другие, при участии HIF-1. Накопление АФК является основополагающим фактором молекулярных механизмов реализации этих процессов. Гибель или выживание клеток опосредованная HIF-1 ассоциирована с активацией транскрипции соответствующих генов-мишеней в условиях определенной продолжительности и степени выраженности гипоксии [137, 197, 273].

Белки семейства HIF являются основными регуляторами клеточного ответа в условиях снижения парциального давления кислорода, однако существуют и другие сигнальные пути, участвующие в этом процессе – каскад UPR (unfolded protein response – респонсивных белков) и киназы mTOR (mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase – киназа млекопитающих рапамицин-ассоциированная мишень). При этом mTOR может изменять скорость трансляции и срок «жизнеспособности» мРНК. Активация mTOR блокируется

при гипоксии за счет определенных HIF-независимых и HIF-зависимых механизмов, что сопровождается подавлением процессов транскрипции мРНК и снижением затрат энергии. Наряду с этим, изменение функционирования ЭПР при гипоксии повлечет за собой нарушение процессов укладки белков в пространстве, что приведет к запуску сигнального каскада, восстановление гомеостаза ЭПР либо запуск реакций гибели клеток [105]. В запуске сигнального каскада ведущая роль принадлежит глюкозорегулируемому шаперону GRP 78 (glucose-regulated protein 78) [105, 272].

Одним из необходимых участников инициации сигнального каскада является глюкозорегулируемый шаперон GRP 78 (glucose-regulated protein 78). В условиях гипоксии в опухолевых клетках при участии HIF-1 происходит запуск активации ряда молекул: ГЛЮТ-1, необходимого для увеличения поставки глюкозы, фактора роста эндотелия сосудов для активного ангиогенеза, IGF2, потенциирующего выживание малигнизированных клеток, рецептора фактора роста гепатоцитов (c-Met), способствующего к распространению и интеграции опухолевых клеток, рецептора 4 для хемокинов подсемейства CXC (C-X-C motif chemokine receptor type 4, CXCR4), повышающего способность к образованию метастазов [8, 9, 87, 263]. Невосприимчивость к проводимой терапии, метастазирование, ухудшение прогноза онкологических заболеваний, по мнению ряда авторов, зачастую обусловлены гипоксией в малигнизированных клетках [45, 162, 228, 231, 263]. При этом различное напряжение кислорода внутри малигнизированных клеток связано с непрерывно изменяющимися условиями жизнедеятельности опухолевых клеток в организме. Известно, что различные биологические последствия для опухолевых клеток возникают при острой, хронической и периодической гипоксии [46, 228]. Стимулирование геномной нестабильности и ангиогенеза, изменение метаболизма клеток в ответ на гипоксию способствуют дальнейшей трансформации нормальных клеток в малигнизированные [231, 263]. При опухолевой прогрессии в условиях гипоксии увеличивается потенциал злокачественности опухолевых клеток за счет генных

мутаций, в том числе в генах белка p53 и рецептора эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, GFR), регулирующих пролиферацию клеток [118, 135].

Индукция и развитие апоптоза происходит при участии ионов кальция и даже незначительные сдвиги во внутриклеточном содержании этого катиона могут нарушать процессы пролиферации и программированной гибели клеток [55]. Поддержание гомеостаза кальция в клетке регулируется ион-транспортными системами, среди которых потенциалуправляемые (voltage-operated channels, VOC) и лигандуправляемые (receptor-operated channels, ROC) кальциевые каналы, обеспечивающие перенос катиона через цитоплазматическую мембрану в клетку [262]. Концентрация ионов кальция в ЭПР определяется работой Ca^{2+}-АТФазы (sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA) pumps – саркоплазматическая Ca^{2+}-АТФаза), чувствительностью рецепторов к инозитол-1,4,5-трифосфату (inositol-1,4,5-triphosphate receptors, IP_3R) и активностью кальцийсвязывающих белков (кальретикулин, кальсеквестрин). В цитоплазме уровень Ca^{2+} достигает 100 нМ и поддерживается в этих пределах благодаря поступлению катиона из ЭПР либо удалению его в межклеточное пространство Ca^{2+}-АТФазой, расположенной на плазмолемме (plasma membrane Ca^{2+}-ATPase, PMCA). Поступление ионов Ca^{2+} в митохондрии происходит независимо от других ионов (унипорт), а выведение – реализуется различными способами. В митохондрии функционируют специализированные поры (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) для выведения ионов Ca^{2+}, а также за счет работы Na^+/H^+-зависимого Ca^{2+}-обменника возможно удалить излишки катиона. Из клетки в межклеточное пространство ионы Ca^{2+} могут выходить с помощью мембранной Ca^{2+}-АТФазы, связывающей кальмодулин, и Na^+/Ca^{2+} обменника (Na^+/Ca^{2+} exchanger, NCX) [243]. Дисбаланс внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+} является важным признаком апоптоза. При этом регистрируется существенное увеличение концентрации этого катиона в цитоплазме, что достигается как его поступлением из вне клетки, так и при высвобождении из ЭПР и митохондрий. Выход ионов

Ca^{2+} из ЭПР происходит через каналы, выполняющие также функцию рецепторов (IP_3R и рианодиновых рецепторов (ryanodine receptors, RyR). На линии клеток яичников китайского хомячка было продемонстрировано, что истощение запасов ионов Ca^{2+} в ЭПР при активации рианодиновых рецепторов индуцирует апоптоз [75]. Также появляется все больше доказательств того, что поступление ионов Ca^{2+} в митохондрии играет ключевую роль в реализации апоптоза [52, 126, 145, 156, 203, 215]. Так, обнаруженные синхронные изменения уровня ионов Ca^{2+} в цитоплазме и митохондриях клеток линии HeLa, вступивших в апоптоз под воздействием TNFα, вызваны выходом ионов Ca^{2+} из ЭПР через IP_3R [140]. Повышение концентрации ионов Ca^{2+} в митохондриях может вызвать открытие МРТР, а также увеличение продукции АФК, что приведёт к дисфункции митохондрий, высвобождению цитохрома с и других медиаторов апоптоза в цитоплазму с последующей активацией каскада каспаз [54, 140].

Гипоксия приводит к нарушению работы митохондрий, развитию ОС и изменению содержания ионов кальция, отражающееся на запуске программированной клеточной гибели. Существует ряд сложностей в установлении механизмов запуска и осуществления апоптотической гибели опухолевых клеток, в том числе активная пролиферация и нарушенная клеточная дифференцировка в условиях некорректного функционирования митохондрий и развивающегося ОС. Таким образом, молекулярные механизмы регуляции сигнального каскада апоптотической гибели клеток по-прежнему требуют уточнения, что обосновывает проведение дальнейших исследований в данной области. Они расширят существующие фундаментальные представления о механизмах поддержания окислительно-восстановительного баланса клетки, контроля функциональной активности ион-транспортирующих систем и нарушения регуляции апоптоза при низком напряжении кислорода в опухолевых клетках.

1.3 Редокс-регуляция метаболизма в опухолевых клетках

Наблюдаемое при гипоксии увеличение продукции АФК сопровождается запуском редокс-зависимых сигнальных путей, определяющих дальнейшую судьбу клетки [68]. Чувствительность компонентов этих путей обусловлена окислительной модификацией макромолекул, которые являются внутриклеточными сенсорами изменения редокс-баланса [204].

Основными достижениями медико-биологической науки последнего времени в области изучения редокс-регуляции клеточных процессов является редокс-управление активностью ключевых компонентов сигнальных путей, клеточной гибели, факторов транскрипции посредством глутатионилирования белков [4, 193]. На сегодняшний день, с точки зрения молекулярной биологии, АФК являются не только цитотоксическими агентами, но и при определенных условиях действуют как сигнальные молекулы для окислительно-восстановительной регуляции клеточных функций [5, 16, 20, 67, 96, 117, 252, 257, 268].

Показано, что большая часть поступающего в клетку кислорода расходуется в процессе окислительного фосфорилирования в митохондриях. Однако, примерно от 2 до 5 % O_2 превращается в АФК. Известно что, основными представителями являются гидроксильный $HO^{\bullet}$ и пероксидный $HOO^{\bullet}$ радикалы, синглетный кислород $^1O_2$, супероксидный анион-радикал $O_2^{\bullet -}$ и, конечно, пероксид водорода H_2O_2 [14, 112].

Антиоксидантная система, включающая в себя ферментативное и неферментативное звено, утилизирует постоянно образующиеся в клетке АФК [21]. К формированию состояния ОС, характеризующегося накоплением окислительных повреждений важных макромолекул в клетке, могут приводить нарушения работы этой системы [69]. Патогенетическую основу целого ряда патологических процессов (опухолевый рост, воспаление и другие) составляет ОС [167, 183, 222]. Основными антиоксидантами являются неферментативные

(глутатион, таурин, витамины Е, С) и ферментативные соединения (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутаредоксины, каталаза, тиоредоксины и пероксиредоксины) [21, 69].

Синтез SH-группу содержащего трипептида – γ-L-глутамил-L-цистеинилглицина (глутатиона), протекает в цитоплазме клеток с затратой энергии АТФ. В реакцию, катализируемую γ-глутамилцистеинсинтетазой, вовлекается глутамат и цистеин с образованием γ-глутамилцистеина, который впоследствии соединяется с глицином при действии глутатионсинтетазы. Синтезированный трипептид способен ингибировать фермент γ-глутамилцистеинсинтетазу, что является важным механизмом регуляции внутриклеточной концентрации восстановленного глутатиона (GSH). Наличие цистеина в составе GSH определяет регуляторную роль трипептида в поддержании функционального состояния дисульфидных связей в белках, а также содержания прооксидантов в клетке [29, 77, 195]. Таким образом, GSH – антиоксидант благодаря окислительно-восстановительной группе за счет атома серы. Важность GSH как компонента внутриклеточного редокс-буфера подтверждена тем, что он содержится в клетках в высоких концентрациях, но проявляет низкий редокс-потенциал ($E_0' = -240$ mV) [29, 195]. Изначально GSH был описан как важный антиоксидант, кроме этого другие его функции в клетке были установлены позднее. Восстановленный глутатион выполняет функцию как основного антиоксиданта, так и принимает участие во внутриклеточной передаче сигналов, метаболизме чужеродных соединений и ксенобиотиков, регулировании процессов апоптоза и пролиферации [20, 29, 71, 99, 129].

Синтезируемый в цитоплазме глутатион, локализуется в различных компартментах клетки, в том числе в ядре, митохондриях и ЭПР [76]. В каждой органелле и в цитоплазме глутатион формирует свой пул соотношения восстановленной и окисленной форм, которые определяют редокс-потенциал компартмента и оказывает влияние на функции клетки [71, 216].

Глутатион компартмента ядра способствует поддержанию функционально активного состояния протеинов, осуществляющих транскрипцию и репарацию ДНК, посредством глутатионилирования их SH-групп [29, 100].

В ЭПР трипептид присутствует в основном в окисленной форме (GSSG). Окисленный глутатион необходим для формирования дисульфидных связей в процессе надлежащего фолдинга синтезируемых белков [100].

Митохондриальный глутатион представлен в основом восстановленной формой (составляет 10-15 % от его общего пула в клетке). При этом, содержание глутатиона в митохондрии и цитозоле составляет 10-14 мМ [100].

В настоящее время установлено, что зачастую реализация сигнальных каскадов, обуславливающих развитие различных биологических ответов в клетке, требует наличия АФК [16, 67, 96, 234]. Однако, выполнять роль вторичного мессенджера может не каждая молекула. Необходимо, чтобы она была нейтральной и низкомолекулярной со способностью проходить через мембраны клеток, продукция такой молекулы должна активироваться в ответ на стимул, а также отличаться селективностью действия на белки, содержащие в составе своего активного центра SH-группы [213, 235, 239].

Отвечает всем перечисленным критериям среди пула АФК только пероксид водорода. Большая часть пероксида водорода образуется в супероксиддисмутазной реакции. Продукция супероксидного анион-радикала ($O_2^{\bullet -}$) протекает преимущественно в митохондриальной дыхательной цепи при одноэлектронном восстановлении кислорода в реакциях, катализируемых I и III комплексами. Высвобождение ($O_2^{\bullet -}$) преимущественно в митохондриальный матрикс (функционирование I комплекса) или по обе стороны внутренней мембраны митохондрий (функционирование III комплекса) обусловлено различными факторами, среди которых важную роль играет внутриклеточная концентрация кислорода [174, 201, 233, 255]. Интенсивность образования супероксидного анион-радикала достаточно сложно оценить, однако эксперименты, проведенные на мышах, косвенно доказывают значительную его

продукцию *in vivo* [28]. Так животные с недостаточной активностью марганцевой супероксиддисмутазы (Mn-СОД, СОД2) погибали в первые 10 дней жизни. Однако в группе животных, получавшей низкомолекулярные антиоксиданты, продолжительность жизни увеличивалась [24, 172]. Фермент супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1) имеет три изоформы: 1) медь-цинковая (Cu, Zn-СОД, СОД1), 2) марганцевая (Mn-СОД, СОД2) и 3) экстрацеллюлярная (Э-СОД, СОД3) [15, 21, 185]. Представительство изоформ этого белка по компартментам клетки различно: цитоплазма содержит СОД1, а митохондрии – СОД2 [241]. Метаболизм H_2O_2 (продукт реакции СОД2) осуществляется в митохондриях преимущественно за счет GSH при участии глутатионпероксидазы и пероксиредоксина, и с последующим восстановлением окисленного глутатиона НАДФН-зависимой глутатионредуктазой [160]. Таким образом, в митохондриях должен поддерживаться баланс между активностью Mn-СОД и системой глутатиона для эффективного избавления от пероксида водорода.

Такие биомолекулы как: $ФАДН_2$, НАДН, $ФМНН_2$, могут спонтанно окисляться в присутствии O_2 с образованием $O_2^{\bullet-}$ [50]. Основная часть внутриклеточного супероксидного анион-радикала преобразуется в H_2O_2. При этом, присутствующий $O_2^{\bullet-}$, который не подвергся трансформации системой антиоксидантной защиты, способен вступать во взаимодействие оксидом азота и металлами переменной валентности – медью, железом, входящими в структуру белков, например, в состав железосерных центров протеинов [25]. С $O_2^{\bullet-}$ способны взаимодействовать железосерные центры рибонуклеотидредуктазы, аконитазы, гуанилатциклазы [25, 250].

Находясь на современных позициях понимания значения и механизмов редокс-регуляции внутриклеточной передачи сигнала, можно утверждать, что наиболее изученным является вклад в данный процесс пероксида водорода. Такое внимание к роли H_2O_2 объясняется способностью данной молекулы участвовать в обратимой окислительной модификации SH-групп белков и регуляции функций протеинов [199]. Пероксид водорода, являясь сигнальной молекулой, способен

реагировать непосредственно с аминокислотными остатками в структуре белков, либо осуществлять опосредованное воздействие на структуру и функции протеинов, изменяя соотношение GSH/GSSG в клетке [233, 264]. Эффекты пероксида водорода зачастую приводят к ингибированию активности ряда ферментов, в том числе белков семейства тирозиновых фосфатаз (protein tyrosine phosphatases, PTPs) [207].

Тиольные группы протеинов, взаимодействующие с H_2O_2 с определенной скоростью, обуславливают возможность редокс-регуляции функционирования белков. При этом, образуемый цистеинтиолат-анион в стурктуре белка, обеспечивает их биодоступность для окислительной модификации. Образование сульфеновой кислоты (R-SOH), посредством депротонирования SH-группы радикала цистеина и его окисления пероксидом водорода, представляет собой молекулярный механизм окислительной модификации белков, являющийся неотъемлемой частью редокс-сигналинга [185, 200].

Ряд белков способен образовывать сульфенаты, что может сопровождаться последующей модификацией или восстановлением протеинов [141, 194]. Сульфеновая кислота *in vivo* необратимо окисляется в присутствии пероксида водорода до сульфиновой и сульфоновой кислот, которые могут играть важную роль в редокс-регуляции активности белков [136, 210].

Наличие в структуре белка остатков цистеина, обладающих свободными SH-группами, обуславливает образование внутримолекулярных или межмолекулярных дисульфидных связей. В случае окисления SH-групп остатков цистеина до сульфенатов белковые молекулы могут образовывать смешанные дисульфиды с глутатионом, цистеином или коэнзимом А [225]. Высокая концентрация трипептида (глутатиона) в клетках определяет то, что глутатионилирование белков является часто регистрируемой модификацией [26, 92].

Участие пероксида водорода в редокс-регуляции может также осуществляться посредством изменения соотношения внутриклеточных

восстановленных и окисленных компонентов редокс-пар глутатиона и тиоредоксина, ответственных за редокс-гомеостаз и редокс-сигналинг. Высокая концентрация в клетках восстановленной формы этих соединений обеспечивается активностью НАДФН-зависимых редуктаз [11, 142, 171, 216, 229].

Благодаря катализу трех основных типов ферментов: каталазы, глутатионпероксидазы и пероксиредоксина – пероксид водорода претерпевает утилизацию [264].

Медленные реакции тиолдисульфидного обмена между окисленным глутатионом и тиоловыми группами белков способен ускорять глутаредоксин [66, 127, 219]. Катализируемое глутаредоксином глутатионилирование белков и последующее ингибирование комплекса I дыхательной цепи митохондрий является одним из примеров того, что окисление компонентов редокс-пар пероксидом водорода может влиять на клеточные процессы [98, 191].

Необходимым условием участия окислительной модификации белков в редокс-сигнализации является контролируемость и обратимость процессов. Процесс взаимодействия GSH и тиоредоксина с H_2O_2 обратимый и редокс-состояние этих молекул способно влиять на посттрансляционную модификацию белков. Это явление (восстановление сульфинатов в составе белков) требует наличия АТФ. Тиоредоксин может восстанавливать активность окисленной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в клетках млекопитающих, находящихся в состоянии ОС [85]. Реакции деглутатионилирования, как и глутатионилирования, катализируются глутаредоксинами [127].

Продукция гидроксильного радикала из пероксида водорода протекает в присутствии ионов металлов переменной валентности (реакция Фентона): $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{-} + HO^{\bullet}$ [179]. Данная реакция может протекать одновременно с восстановлением иона металла пероксидом водорода: $Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + H^{+} + HOO^{\bullet}$. Такое сочетание реакций приводит к генерации радикалов ($HO^{\bullet}$ и $HOO^{\bullet}$) из H_2O_2 в присутствии ионов металлов железа или меди: $2H_2O_2 \rightarrow H_2O + HOO^{\bullet} + HO^{\bullet}$ [205].

В клетке при увеличении продукции $HOO^{\bullet}$ могут образовываться и другие АФК, в том числе $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2, которые, взаимодействуя между собой при участии металлов переменной валентности, могут генерировать гидроксильный радикал: $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + HO^- + HO^{\bullet}$. Данная реакция называется реакцией Габера-Вейса. Вместе реакции Фентона и Габера-Вейса описывают ключевые процессы в химии АФК, поскольку радикалы $HO^{\bullet}$ и $HOO^{\bullet}$ являются сильными окислителями и наиболее токсичными представителями АФК в клетках. Так, их образование объясняет значительное повышение токсичности пероксида водорода в присутствии ионов железа и меди, а также дает основание для разработки новых методов терапии, основанных на формировании хелатных комплексов с ионами металлов [132].

Так как, подобно большинству АФК пероксид водорода является токсичным для клеток, то существуют ферменты, утилизирующие его: каталаза (КФ 1.11.1.6) и глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9) [21, 102]. Наличие в активном центре атома Se в составе остатка аминокислоты L-селеноцистеина является важной особенностью этого фермента [11, 238]. Глутатионпероксидаза катализирует восстановление H_2O_2, но в отличие от каталазы, для осуществления реакции необходим GSH в роли восстанавливающего агента. Этот факт позволяет рассматривать глутатионпероксидазу как редокс-сенсор восстановленной формы трипептида в клетке. Различные изоферментные формы глутатионпероксидазы, отличающиеся по локализации в организме и субстратной специфичности, превращая перекиси вовлекаются в процессы клеточного редокс-сигналинга. В результате такой ферментативной реакции высвобождается GSSG, который инициирует посттрансляционную модификацию белков (глутатионилирование) [101, 136, 182].

В восстановлении GSSG принимает участие НАДФН•H^+ и глутатионредуктаза (КФ 1.8.1.7). Пероксиредоксины (КФ 1.11.1.15) восстанавливают пероксид водорода посредством участия SH-групп белков, в основном тиоредоксина. Окисленная форма тиоредоксина восстанавливается

тиоредоксинредуктазой в присутствии НАДФН•H^+. Несмотря на то, что каталитическая эффективность пероксиредоксинов не очень высока, они вносят значительный вклад в защиту от повреждающего действия пероксида водорода, так как обладают к нему высокой аффинностью и содержатся в клетке в больших концентрациях. Пероксиредоксины, содержащие два остатка цистеина, взаимодействуют с H_2O_2 с образованием сульфеновых кислот, которые затем быстро превращаются во внутримолекулярные дисульфиды. Однако при значительном увеличении концентрации пероксида водорода сульфеновые кислоты могут реагировать со второй молекулой H_2O_2 с формированием сульфиновых кислот, при этом происходит инактивация фермента [23]. Благодаря этому механизму пероксид водорода избегает преждевременной деградации и участвует в сигнальных каскадах [125]. В ряде исследований было показано, что данные события могут происходить при довольно низких концентрациях H_2O_2, что объясняется структурными особенностями пероксиредоксинов [270].

1.4 Окислительная модификация белков – молекулярный механизм селективного управления активностью белков в норме и при опухолевом росте

Одним из перспективных направлений современной экспериментальной медицины является поиск молекулярных механизмов таргетного управления метаболизмом опухолевой клетки с целью активации механизмов клеточной гибели. За счет реакций тиолдисульфидного обмена с участием GSH в клетках происходит обезвреживание различных электрофилов и окислителей, в результате чего предотвращается химическая возможность их взаимодействия с белками и прочими макромолекулами. Одним из продуктов данных реакций является окисленная форма тиола, которая является реакционно-способной по отношению к свободным SH-группам белков. Вступая во взаимодействие с белками клетки, GSSG способствует их окислительной модификации, изменению конформации и

функции протеина [170]. Ключевые механизмы, связанные с внутриклеточной передачей сигнала, пролиферацией и апоптозом клеток, контролируются при участии глутатиона. При этом, его роль определяется участием в глутатионилировании белков, то есть образованием смешанных дисульфидов (белок-SSG) [127, 130, 170, 217].

Как уже отмечалось, АФК, GSH и SH-группы белков участвуют в редокс-регуляции внутриклеточной передачи сигнала. Так, к примеру, H_2O_2 активирует транскрипционный фактор NF-κB, в низких концентрациях обладает митогенным потенциалом в отношении ряда клеток, и при этом H_2O_2-опосредованные события связаны с глутатионилированием белков. Однако на данный момент нет полного представления о биологической роли глутатиона в клетках. Отчасти это обусловлено его широким вовлечением в различные реакции (окислительно-восстановительные, тиол-дисульфидного обмена и конъюгации) [235].

Образование дисульфидов в процессе окисления предполагает накопление симметричных (XSSX) и ассиметричных (XSSR), высоко- и низкомолекулярных дисульфидов (S-тиоляция). Обратный процесс (детиоляция) протекает в присутствии восстанавливающих агентов (НАДФН•H^+) и при участии ряда оксидоредуктаз: глутаредоксина, глутатионредуктазы, тиоредоксина и тиоредоксинредуктазы. Считается, что процесс детиоляции более сложный, поскольку наблюдаются перестановки дисульфидных связей через реакции тиол-дисульфидных обменов [170].

В настоящее время показано глутатионилирование около 100 белков, причем примерно 20 из них подвержены и другим типам посттрансляционной модификации, не затрагивающей остатки аминокислоты цистеина в их структуре. К таким изменениям, в частности, относится карбонилирование белков (по остаткам лизина, аргинина, пролина и треонина) [4, 27, 108, 166]. Предположительно данный тип посттрансляционной модификации не выполняет регуляторную функцию, поскольку, в отличие от глутатионилирования, не обратим [108]. Однако ряд авторов утверждает, что наряду с обратимой,

необратимая окислительная модификация белков также способствует изменению функциональной активности мембранно-ассоциированных, цитоплазматических, митохондриальных и других протеинов, регулирующих жизнедеятельность клеток [57, 63, 78, 166, 198, 237].

В условиях гипоксии усиление продукции АФК (в частности, HO•) и снижение антиоксидантного потенциала в опухолевой клетке сопровождается накоплением карбонильных производных белков. Известно, что самым мощным радикалом, способствующим образованию карбонильных производных белков, является HO•. Его действие направлено на атаку α-C-H связи пептидной цепи, кольца тирозиновых, триптофановых и гистидиновых аминокислотных остатков белков. В результате образуются битирозиновые сшивки, алкокси-, гидрокси-, перокси-производные белков [4, 108, 192]. Важно отметить, что восстановленная форма глутатиона является эффективным протектором карбонилирования белков за счет снижения уровня АФК [97].

Необратимое окисление протеинов повышает их чувствительность к протеолитическому распаду, так как в клетке отсуствуют ферментативные системы, позволяющие восстановить карбонильную модификацию белков. Известно, что защитной реакцией клетки на процесс карбонилирования является увеличение содержания белков теплового шока [51, 251]. Необходимо отметить ведущую роль белков теплового шока в обеспечении направленности на деградацию карбонильных производных протеинов [97].

Заключение

Таким образом, пристальное внимание в настоящее время уделяется исследованиям, направленным на поиск редокс-чувствительных мишеней для регуляции и реализации апоптоза с целью профилактики и терапии рака. Нарушение реализации апоптоза отмечается при опухолевом росте, являясь важным патогенетическим фактором, определяющим возникновение и развитие

злокачественных новообразований. Селективная активация апоптоза в опухолевых клетках является одной из целей разрабатываемой в настоящее время противоопухолевой терапии [93, 186, 275]. Опухолевый рост характеризуется активацией свободно-радикального окисления и нарушением редокс-баланса клетки. Условия гипоксии способствуют нарушению функции митохондрии и усугубляют ОС в опухолевых клетках. Активные формы кислорода являются повреждающими факторами макромолекул клетки, способствуют их окислительной модификации, а также могут принимать непосредственное участие в клеточной сигнализации [57, 170, 237]. Компоненты системы глутатиона вносят существенный вклад в антиоксидантную защиту и в окислительную модификацию белков клеток, в том числе и в условиях гипоксии. Однако, по данным литературы, до сих пор нет четкого и однозначного представления о молекулярных механизмах участия глутатионовой системы и окислительной модификации белков (глутатионилирования и карбонилирования) в изменении функциональной активности белков-эффекторов рецепторного и митохондриального пути реализации апоптоза в условиях гипоксии. Поэтому модуляция редокс-гомеостаза системы глутатиона и опухолевых клеток в целом рассматривается одним из переспективных подходов в таргетной терапии рака [36, 77, 216].

Таким образом, опухолевые клетки, находящиеся в условиях гипоксии, характеризуются активацией свободно-радикального окисления на фоне нарушения регуляции апоптоза и формирования устойчивости к химиотерапевтическому воздействию. В связи с этим, для дальнейшего уточнения патогенеза опухолевого роста и формирования аспектов персонифицированной противоопухолевой терапии, требуется углубленное изучение молекулярных механизмов, вовлеченных в регуляцию и реализацию апоптотической гибели опухолевых клеток при недостаточном снабжении кислородом. Все вышеизложенное определяет актуальность проведенного исследования.

Глава 2. Материал и методы исследования

2.1 Материал исследования

Материалом для исследования служили опухолевые клетки линии P19 (тератокарцинома мыши C3H/He), которые были получены из Российской коллекции клеточных культур ФГБУН Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, Россия). Клеточная линия P19 представляет собой клетки мышиной тератокарциномы, имеющие нормальный кариотип. Указанные клетки представляют собой форму злокачественной опухоли из зародышевых клеток, включающих компонент недифференцированной эмбриональной карциномы, и дифференцированные производные всех трех зародышевых листков. Данные клетки способны синтезировать лактатдегидрогеназу и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу, а также дифференцироваться в нейрональные или глиальные клетки в присутствии ретиноевой кислоты, или в сердечные и скелетные клетки в присутствии диметилсульфоксида (ДМСО). Кариологическая характеристика культуры: 2n = 40, нормальный кариотип мыши (40, XY) (https://incras-ckp.ru/catalog/p19/). При выполнении работы опухолевые клетки линии P19 культивировали в режиме поддержания жизнеспособности и не подвергали дополнительному воздействию веществ, способствующих их дифференцировке.

Перед выполнением исследования была проведена процедура утверждения плана эксперимента Этическим комитетом ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (протокол заседания от 25.02.2013 г., № 3258).

Для достижения поставленной цели опухолевые клетки линии P19 культивировали при нормоксии и гипоксии в условиях модуляции редокс-статуса с помощью либо блокатора, либо протектора тиоловых групп, либо предшественника синтеза глутатиона. Комплексная оценка апоптоза в клетках линии P19 (тератокарциномы) включала определение количества апоптотически измененных клеток, со сниженным митохондриальным мембранным потенциалом, а также числа TNF RI- и Fas-положительных клеток. Для оценки ОС

определяли содержание внутриклеточных АФК, продуктов окислительной модификации белков и компонентов системы глутатиона. Определяли внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+}.

Данная работа была выполнена на кафедре биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заведующий кафедрой – д-р мед. наук, доцент Спирина Л.В.), базе научно-образовательного центра молекулярной медицины ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (руководитель – канд. мед. наук, доцент Шахристова Е.В.) и лаборатории биологических моделей ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (руководитель – канд. биол. наук, доцент Иванов В.В.).

2.2 Культивирование клеток

Клетки культивировали в стандартных флаконах Т25 («JETBIOFIL», Китай) в CO_2-инкубаторе «MCO-5AC» («Sanyo», Япония) при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2. Для роста клеточной массы использовали полную питательную среду α-МЕМ («БиолоТ», Россия) с добавлением гентамицина в концентрации 0,1 мг на 1 мл («Микроген», Россия), аминокислоты L-глутамина в концентрации 0,3 мг на 1 мл («БиолоТ», Россия) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («БиолоТ», Россия), которую предварительно инактивировали в течение 30 минут при t=56 °С. Культивирование проводили с интервалом 2 дня и при достижении субконфлюентного слоя рассаживали клетки. Перед началом пересадки удаляли среду для культивирования и добавляли необходимое количество раствора трипсин-версена («БиолоТ», Россия) (в соотношении 1:1). Клетки инкубировали при 37 °С несколько минут постоянно покачивая флакон до момента отсоединения клеток от поверхности флакона. После этого культуру переносили в пробирку для центрифугирования и добавляли 5 мл питательной среды для инактивации трипсина. Образцы подвергали пипетированию с целью получения популяции диспергированных клеток, после чего центрифугировали 3 минуты

при 300 g. Супернатант, содержащий трипсин, удаляли, а клеточный осадок аккуратно ресуспендировали в 2 мл полной питательной среды. Далее по 200 мкл полученной клеточной суспензии разливали по культуральным флаконам, содержащим 5 мл готовой свежей среды α-МЕМ.

Перед постановкой эксперимента оценивали жизнеспособность клеток с помощью 0,4 % раствора красителя трипанового синего («Serva», США). Для определения числа погибших клеток использовали камеру Горяева. В опыте использовали культуры клеток, содержащие не более 5 % погибших клеток.

Для формирования резервного пула клетки аккуратно снимали с субстрата (как описано выше), центрифугировали 3 минуты при 300 g и ресуспендировали в полной питательной среде. Далее подсчитывали число живых клеток, затем культуру клеток переносили в ампулы для замораживания (криотубы) в концентрации 1×10^7 клеток/мл (в среде для замораживания в качестве криопротектора использовался ДМСО («ПанЭко», Россия) в конечной концентрации 10 %). Образцы клеток хранились при -70 °С с периодической проверкой на стерильность и жизнеспособность культуры.

2.3 Условия культивирования клеток и тесты *in vitro*

Для оценки роли редокс-статуса в регуляции апоптоза опухолевые клетки линии P19 (суспензия клеток, стандартизированная до 2×10^6 клеток/мл) инкубировали в полной питательной среде α-МЕМ в условиях нормоксии или гипоксии с соблюдением стерильности и дополнительным добавлением либо блокатора, либо протектора SH-групп пептидов и белков, либо предшественника синтеза глутатиона.

В качестве блокатора SH-групп пептидов и белков применяли N-этилмалеимид (NEM) («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 5 мМ [226]. Попадая в клетку, NEM взаимодействовал со свободными SH-группами пептидов и белков. В роли протектора SH-групп пептидов и белков применяли

восстановитель дисульфидных связей 1,4-дитиоэритритол (DTE) («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 5 мМ [49]. Предшественник синтеза глутатиона N-ацетилцистеин (NAC) («Sigma-Aldrich», США) использовали в конечной концентрации 5 мМ [208].

Культуру инкубировали в условиях нормоксии или гипоксии в течение 18 часов при температуре 37°С без или с добавлением одного из исследуемых веществ (NEM или NAC, или DTE). Клеточная культура в день эксперимента не превышала 80 % от достижения конфлюэнтного слоя.

После завершения периода инкубации оценивали продукцию АФК, окислительную модификацию белков, состояние системы глутатиона, внутриклеточное содержание ионов Ca^{2+} и реализацию апоптоза в клетках опухолевой линии P19. Во всех группах размер выборки (n) был равен 5, кроме определения количества аннексин-положительных клеток (n=6). Измерение растворенного кислорода проводили только в группах «нормоксия» и «гипоксия».

2.4 Моделирование гипоксии

Для моделирования гипоксии с применением инкубационной камеры «Hypoxia Incubator Chamber» («STEMCELL», Канада) использовали культуру клеток опухолевой линии P19, подготовленную и стандартизованную как описано выше (Рисунок 1). Для подготовки камеры открывали клапаны на трубках у основания камеры для подачи газовой смеси. Далее открывали и убирали металлический кольцевой хомут, соединяющий крышку и основание камеры. Затем открывали камеру, сняв крышку и убрав поддоны. Для поддержания необходимого уровня влажности (предупреждающего испарение и уменьшение уровня питательной среды в культуральных планшетах/флаконах) в камеру помещали открытую чашку Петри, содержащую дистиллированную воду. Подобрав необходимое количество поддонов, располагали на них планшеты с

исследуемой культурой и закрывали камеру крышкой. После этого плотно фиксировали металлический кольцевой хомут.

Рисунок 1 – Инкубационная камера «Hypoxia Incubator Chamber» («STEMCELL», Канада)

Для создания гипоксических условий внутри камеры одну из трубок у её основания подсоединяли к баллону с готовой газовой смесью через редуктор, регулирующий подачу газа. Для удаления кислорода, находящегося внутри камеры, через неё пропускали газовую смесь (5 % O_2, 90 % N_2, 5 % CO_2) со скоростью 20 л/мин в течение 8 минут. После чего быстро отключали подачу газа и полностью закрывали входной и выходной клапаны. Камеру помещали в термостат (37 °C) на 18 часов.

Для контроля гипоксии в эксперименте проводили измерение содержания растворенного в культуральной среде кислорода. Концентрация O_2 измерялась с помощью оксиметра «Dissolved Oxygen Meter» («HANNA HI 9146», Италия).

2.5 Приготовление клеточных лизатов

Для приготовления натрий-фосфатного буфера (1X раствор PBS 0,01 M (pH=7,4)) брали 10X раствор PBS (pH=7,4) («Ambion», США) и разводили дистиллированной водой в отношении 1:9.

Для проведения исследований клетки отмывали от питательной среды и ресуспендировали в 1X растворе PBS (pH=7,4), используя объём буфера, сохраняющий концентрацию 2×10^6 клеток/мл. Активность глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, концентрацию карбонильных производных белков и содержание общего белка оценивали в лизате клеток, полученном добавлением 1 % раствора тритона X-100 («Sigma-Aldrich», США) (конечная концентрация 0,1 %).

Перед приготовлением клеточных лизатов для определения содержания фракций глутатиона образцы промывали 2 мл холодным 1X раствором PBS (без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}) (pH=7,4). Затем добавляли 1 мл раствора трипсина-версена (1:1) («БиолоТ», Россия) на 3 минуты в каждый образец для снятия клеток с пластика, после чего нейтрализовали трипсин добавлением 1 мл полной питательной среды. Переносили клеточную суспензию в подготовленные заранее пробирки. Клетки осаждали центрифугированием (300 g, 5 минут). Отбрасывали супернатант и ресуспендировали клеточный осадок в 1 мл 1X растворе PBS (pH=7,4). Производили подсчет клеток с помощью камеры Горяева. Снова центрифугировали при тех же условиях и удаляли супернатант. Для получения лизата клетки ресуспендировали в 1 мл экстракционного буфера (0,1 М раствор калий-фосфатного буфера (КРЕ) (pH=7,5) («Sigma-Aldrich», США), содержащего 0,1 % тритона X-100, 0,6 % сульфосалициловой кислоты («Sigma-Aldrich», США) и 5 мМ этилендиаминтетраацетата-Na (ЭДТА-Na) («Amresco», США). Для достижения полного лизирования клеток пробы дважды замораживали и размораживали. Далее центрифугировали образцы при 3000 g в течение 10 минут. После чего быстро переносили супернатант в новые пробирки Эппендорфа (оставляя 100 мкл супернатанта над осадком). Супернатант использовали для определения концентрации глутатиона в образцах. Осадок использовался для определения содержания SH-групп белков и белково-связанного глутатиона.

2.6 Оценка реализации апоптоза аннексиновым тестом в опухолевых клетках линии P19

В настоящее время установлено, что перемещение фосфатидилсерина во внешний слой плазмолеммы является признаком ранней стадии апоптоза. Поскольку аннексин V в присутствии ионов Ca^{2+} обладает способностью с высокой специфичностью связываться с фосфатидилсерином, то для обнаружения клеток, вступающих в апоптоз, широко применяются коньюгаты данного белка с флуорохромом, например с флюоресцеин изотиоционатом – FITC (Annexin V-FITC). Мембраны клеток, находящихся в состоянии некроза или на поздних стадиях апоптоза, становятся проницаемыми для витальных красителей, в том числе и для пропидия йодида (PI), интерколирующего с молекулой ДНК.

Для детекции апоптоза использовали набор Annexin V-FITC («eBioscience», США). Процедуру анализа выполняли согласно инструкции фирмы производителя. Для приготовления рабочего раствора (1X) связывающего буфера его разводили в 4 раза дистиллированной водой (в соответствии с протоколом фирмы производителя).

После инкубации клетки отмывали в 1X раствором PBS (pH=7,4), путем центрифугирования суспензии клеток 5 минут при 300 g, удаления супернатанта и добавления 1 мл охлажденного 1X раствора PBS (pH=7,4), ресуспендирования на вортексе, затем снова центрифугирования при тех же условиях и удаления надосадочной жидкости. Далее, согласно протоколу фирмы производителя набора, клетки ресуспендировали в 100 мкл 1X связывающего буфера (1×10^6 клеток/мл). К клеточной суспензии добавляли 3 мкл раствора аннексина V, меченного FITC, и 5 мкл раствора пропидия иодида, после чего инкубировали в течение 15 минут в темноте. Далее в каждый образец вносили 300 мкл 1X связывающего буфера и анализировали на проточном цитометре «FACSCanto II» («BD», США).

Оценивали размер клетки по малому угловому светорассеиванию (forward scatter, FSC), цитоплазматические и мембранные особенности клетки – по боковому светорассеиванию (side scatter, SSC), а также показатель флуоресценции на двух каналах (зеленый для FITC и красный для PI). Исследуемую популяцию клеток гейтировали в координатах FSC (ось абсцисс) и SSC (ось ординат), затем анализировали на наличие флуоресценции. Использовали автоматическое программное обеспечение FACSDiva Version 6.1.3. Осуществлялся подсчет FITC-положительных клеток ($FITC^+/PI^-$ и $FITC^+/PI^+$), результаты представляли в виде соотношения числа аннексин-положительных клеток к их общему количеству (в %).

2.7 Оценка митохондриального мембранного потенциала в опухолевых клетках линии P19

На начальных этапах апоптоза происходит снижение величины трансмембранного потенциала митохондрий ΔΨ. В ряде исследований было показано, что уменьшение ΔΨ связано с высвобождением цитохрома ***c*** и реализацией программы апоптоза. Определение ΔΨ позволяет понять роль митохондрий в реализации программированной гибели клеток.

В работе был использован метод проточной цитометрии для оценки ΔΨ в клетках. Анализ митохондриального мембранного потенциала проводили с использованием набора Flow Cytometry Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit («BD Biosciences», США).

Входящий в состав набора JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин йодид) представлял собой липофильный флуорохром, используемый для оценки ΔΨ. Флуоресценция JC-1 зависела от его концентрации, которая, в свою очередь, определялась величиной ΔΨ. Ключевой особенностью данного флуорохрома являлась его способность находиться в клетке в двух формах. При низких концентрациях JC-1 существовал в виде

мономеров, а в высоких концентрациях образовывал агрегаты, отличающиеся спектром флуоресценции.

При инкубации клеток с JC-1 флуорохром проникал через цитоплазматическую мембрану в форме мономеров. Дальнейшее его поглощение митохондриями регулировалось величиной ΔΨ. В норме внутренняя митохондриальная мембрана поляризована, в таких условиях JC-1 быстро накапливался в митохондриях, что приводило к формированию его агрегатов, которые обладали флуоресценцией в красном спектральном диапазоне (λ=590 нм), измеряемой на FL-2 канале большинства современных проточных цитометров. При этом как для агрегатов, так и для мономеров JC-1 была характерна флуоресценция в зеленой области спектра (λ=527 нм), регистрируемая на FL-1 канале приборов.

JC-1 не накапливался в митохондриях с деполяризованной внутренней мембраной и оставался в цитоплазме в виде мономеров. Более того, образование агрегатов обратимо, поэтому при снижении ΔΨ при апоптозе JC-1 выходил из митохондрий в цитоплазму, что было обнаружено по снижению флуоресценции в красной области спектра (λ=590 нм).

Приготовление реагентов осуществлялось согласно протоколу фирмы производителя.

Суспензию клеток (в количестве 1×10^6 клеток/мл), приготовленную по завершению периода инкубации, центрифугировали в течение 5 минут при 300 g и удаляли супернатант, далее отмывали от культуральной среды с использованием 1X раствора PBS (pH=7,4). По 1 мл каждого образца переносили в стерильные специальные пробирки и центрифугировали 5 минут при 400 g. Супернатант аккуратно удаляли. К осадку добавляли 0,5 мл свежеприготовленного рабочего раствора JC-1 и аккуратно ресуспендировали клетки. Далее образцы инкубировали 15 минут при 37 °C в CO_2-инкубаторе. Для первичной отмывки клеток в пробирки добавляли 2 мл 1X раствора реакционного буфера, после мягкого ресуспендирования образцы центрифугировали 5 минут

при 400 g и удаляли супернатант. Для вторичной отмывки добавляли 1 мл 1X раствора реакционного буфера и центрифугировали при тех же условиях. Для анализа на проточном цитометре клетки ресуспендировали в 0,5 мл 1X растворе реакционного буфера.

Распределение клеток в процентах по каналам флуоресценции (FL-1 и FL-2) анализировали на проточном цитометре «FACSCanto II» («BD», США) с применением программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3.

2.8 Оценка количества TNF RI- и Fas-положительных опухолевых клеток линии P19

По истечении инкубации образцы (1×10^6 клеток/мл) отмывали от питательной среды с помощью 1X раствора PBS (pH=7,4). В специальных пробирках клетки ресуспендировали в 100 мкл раствора Flow Cytometry Staining Buffer (1X раствор PBS, содержащий 0,5 % BSA и 0,1 % NaN_3) («R&D Systems», США). Далее добавляли по 10 мкл антител к Fas или TNF RI («R&D Systems», США) (конечная концентрация 2,5 мкг/10^6 клеток) согласно протоколу фирмы производителя. Оставляли пробы на 30 минут в темноте. Затем центрифугировали 5 минут при 300 g и удаляли супернатант. Для анализа на проточном цитометре «FACSCanto II» («BD», США) клетки ресуспендировали в 400 мкл 1X раствор PBS (pH=7,4). Результат выражали в % от общего числа клеток.

2.9 Оценка жизнеспособности опухолевых клеток линии P19 МТТ-тестом

Жизнеспособность опухолевых клеток линии P19 определяли *in vitro* с использованием солей тетразолия (3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ)). Принцип метода основан на восстановлении желтого МТТ ферментами митохондрий метаболически активных клеток

(преимущественно сукцинатдегидрогеназой) до гидрофобных темно-фиолетовых кристаллов формазана, которые в последствии после растворения определяли спектрофотометрическим методом [260].

Для приготовления стокового раствора МТТ растворяли 1,15 мг МТТ («ПанЭко», Россия) в 1 мл 1Х раствора PBS (pH=7,4). Для приготовления рабочего раствора МТТ брали 125 мкл стокового раствора и 875 мкл 1Х раствора PBS (pH=7,4).

Опухолевые клетки линии Р19 культивировали в условиях нормоксии или гипоксии, а затем подвергали воздействию блокатора или протектора SH-групп пептидов и белков или предшественника синтеза глутатиона в условиях нормоксии и гипоксии. После завершения периода инкубации монослойную культуру снимали с субстрата. Суспензию клеток отмывали один раз с помощью 1Х раствора PBS (pH=7,4) с последующим центрифугированием при 300 g в течении 2 минут. Далее удаляли надосадочную жидкость, а к осадку добавляли 1 мл рабочего раствора МТТ. Все образцы инкубировали 3 часа при 37 °С в суховоздушном термостате «ТС-1/80 СПУ» (Россия), затем центрифугировали (2 минуты, 300 g) и сливали раствор МТТ. В каждую пробу вносили 1,5 мл 96 % раствора изопропанола («Экос-1», Россия) для растворения кристаллов формазана. Концентрацию восстановленного продукта определяли с помощью спектрофотометра «СФ-2000» («ОКБ-Спектр», Россия) при длине волны 570 нм. Результат выражали в % от контроля, в качестве которого выступали клетки, культивируемые в условиях нормоксии без добавления модуляторов редокс-статуса.

2.10 Определение уровня продукции активных форм кислорода в опухолевых клетках линии Р19

Измерение концентрации АФК в клетках проводили с помощью флуоресцентного красителя: 2,7-дихлорфлуоресцеин-3,6-диацетата (ДХФ-ДА) («Sigma-Aldrich», США). После попадания в клетку ДХФ-ДА подвергается

деацетилированию внутриклеточными эстеразами с образованием не флуоресцирующего продукта, который в дальнейшем окисляется АФК в 2,7-дихлорофлуоресцин (ДХФ), обладающий способностью к флуоресценции. Таким образом, он может быть измерен методом флуоресцентной спектроскопии при длине волны возбуждения 495 нм и длине волны испускания 529 нм. Интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации АФК в клетке [107].

Первым шагом являлось приготовление маточного раствора ДХФ-ДА (20 мМ раствор ДХФ-ДА на этиловом спирте). Рабочий раствор ДХФ-ДА готовили *ex tempore*, для этого 1 мкл маточного раствора ДХФ-ДА смешивали с 399 мкл 50 мМ раствора NaN_3 («Sigma-Aldrich», США).

После снятия клеток с поверхности культуральных флаконов раствором трипсин-версена и отмывки их с помощью 1Х раствора PBS (pH=7,4), переносили по 90 мкл клеточной взвеси (2×10^6 клеток/мл) в пробирки для проточного цитометра и добавляли по 10 мкл рабочего раствора ДХФ-ДА. После чего смесь инкубировали 20 минут при 37 °С. Затем добавляли 11 мкл 0,2 % раствора ЭДТА-Na и образцы снова инкубировали при 37 °С в течение 30 минут. Затем образцы дважды отмывали приготовленным раствором PBS (pH=7,4) и клеточный осадок ресуспендировали в 400 мкл холодного буферного раствора.

Непосредственно перед анализом на проточном цитометре «FACSCanto II» («BD», США) осторожно пипетировали клетки. Для детектирования спектра флуоресценции использовали FL-1 канал. Результат выражали в условных единицах (у.е.).

2.11 Оценка продукции гидроксильного радикала в опухолевых клетках линии Р19

Принцип метода основан на воздействии гидроксильного радикала, образовавшегося в клетке при опсонизации зимозаном, на 2-дезокси-D-рибозу и ее разрушение [253].

В две пробирки вносили по 250 мкл суспензии клеток (2×10^6 клеток/мл), 250 мкл 15 мМ раствора 2-дезокси-D-рибозы («Sigma-Aldrich», США) на среде Хенкса (pH=7,4) («Sigma-Aldrich», США) и 30 мкл раствора зимозана («Sigma-Aldrich», США). Далее в первую пробу добавляли 250 мкл 240 мМ раствора абсолютного этанола, а во вторую – 250 мкл среды Хенкса; инкубировали 30 минут при t=37°C, затем добавляли по 0,6 мл 1 % раствора тиобарбитуровой кислоты («Sigma-Aldrich», США) и 0,6 мл 2,8 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). После 15-минутной инкубации при t=100 °C и охлаждения пробы центрифугировали при 500 g в течение 10 минут. Используя спектрофотометр «СФ-2000» («ОКБ-Спектр», Россия), проводиди измерение оптической плотности проб при длине волны 532 нм.

При расчете учетывали разведение проб и коэффициент молярной экстинкции продукта реакции ($1,56\times10^5$ $M^{-1}см^{-1}$). Результаты выражали в нмоль/мг белка.

2.12 Определение концентрации глутатиона в опухолевых клетках линии Р19

2.12.1 Измерение концентрации общего, восстановленного и окисленного глутатиона

Метод основан на детекции при длине волны 412 нм 5'-тио-2-нитробензойной кислоты (ТНБ), полученной при взаимодействии глутатиона (GSH) с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБ). Образование окисленного аддукта (GS-ТНБ) в реакции было пропорционально содержанию глутатиона в образце. GS-ТНБ далее восстанавливался глутатионредуктазой в присутствии НАДФН•H^+. Восстановленный глутатион снова участвовал в реакции.

Поскольку глутатионредуктаза восстанавливала одну молекулу окисленного глутатиона с образованием двух молекул восстановленного, то

количество измеренного глутатиона представляло собой совокупность GSH и GSSG в образце. Калибровочную кривую строили по образцам с известной концентрацией GSH. Скорость изменения оптической плотности при λ=412 нм была линейно пропорциональна общей концентрации глутатиона.

Концентрацию GSSG измеряли немедленно для предотвращения окисления GSH в исследуемом образце и сдвига соотношения GSH/GSSG. При этом к клеточному лизату добавляли 2-винилпиридин, который ковалентно связывался с GSH, но не с GSSG. Излишек 2-винилпиридина нейтрализовали триэтаноламином.

Данный метод являлся модификацией метода, предложенного F. Tietze [202].

В качестве буфера использовали КРЕ: 0,1 М калий-фосфатный буфер с добавлением 5 мМ ЭДТА-Na (pH=7,5). Для приготовления 0,1 % раствора тритона Х-100 с 0,6 % раствором сульфосалициловой кислоты на КРЕ добавляли 20 мкл тритона Х-100 и 120 мг сульфосалициловой кислоты к 20 мл КРЕ буфера (pH=7,5). Раствор готовили непосредственно перед использованием и держали на льду. Сульфосалициловая кислота ингибировала γ-глутамилтрансферазу и предотвращала потерю GSH.

Для приготовления стокового стандартного раствора GSH растворяли 1 мг GSH («Sigma-Aldrich», США) в 1 мл КРЕ. Стоковый раствор разводили в отношении 1:100 КРЕ буфером для получения рабочего раствора GSH с концентрацией 10 мкг/мл. Далее разбавляли 800 мкл рабочего раствора GSH с помощью 200 мкл КРЕ буфера для получения максимальной стандартной концентрации (26,4 нмоль/мл). После чего готовили серию двукратных разведений стандартных растворов с концентрациями 26,4; 13,2; 6,6; …; 0,103 нмоль/мл. Для построения калибровочной кривой использовали приготовленные стандартные растворы глутатиона.

В вытяжном шкафу 2-винилпиридин («Wako», Япония) разбавляли в отношении 1:10 КРЕ буфером и хранили на льду. Триэтаноламин («Sigma-

Aldrich», США) разбавляли в отношении 1:6 КРЕ буфером и хранили на льду во время проведения анализа.

Непосредственно перед использованием готовили рабочий раствор ДТНБ путем растворения 2 мг ДТНБ ((«Sigma-Aldrich», США) в 3 мл КРЕ. А также рабочий раствор НАДФН•H^+ путем растворения 2 мг НАДФН•H^+ («Sigma-Aldrich», США) в 3 мл КРЕ, которые держали до использования в темноте.

Непосредственно перед использованием готовили рабочий раствор глутатионредуктазы («Sigma-Aldrich», США) (250 units ml-1) путем разведения 40 мкл фермента в 3 мл КРЕ.

Определение концентрации общего и окисленного глутатиона в клеточных лизатах проводили на спектрофотометре «СФ-2000» («ОКБ-Спектр», Россия). Перед измерением готовили реагенты как описано выше. Затем в кювету (объем 1 мл) добавляли 700 мкл КРЕ буфера, после чего переносили 100 мкл образца или стандартного раствора GSH с известной концентрацией. Следующим шагом было внесение в кювету рабочих растворов ДТНБ и глутатионредуктазы (по 60 мкл). Далее пробы инкубировали в течение 30 секунд для превращения GSSG в GSH и добавляли 60 мкл рабочего раствора НАДФН•H^+. Измеряли изменение оптической плотности за 1 минуту. Концентрацию глутатиона в образце рассчитывали с помощью калибровочного графика.

В случае определения концентрации GSSG предварительно к 100 мкл исследуемого образца прибавляли 2 мкл раствора 2-винилпиридина и инкубировали в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение 1 часа. После завершения инкубации вносили в пробирку 6 мкл приготовленного раствора триэтаноламина, перемешивали и оставляли на 10 минут.

Концентрацию восстановленного глутатиона рассчитывали как разницу между концентрацией общего и окисленного глутатиона. Результаты представляли в нмоль/мг белка. Дополнительно рассчитывали величину отношения GSH/GSSG, как маркера ОС.

2.12.2 Измерение концентрации глутатиона, связанного с SH-группами белков в опухолевых клетках линии P19

Для измерения концентрации белково-связанного глутатиона к осадку, полученному при приготовлении клеточных лизатов, добавляли 1 мл 1 % раствора $NaBH_4$ («Amresco», США) (для высвобождения молекул глутатиона из связи с белками) [152]. После этого вносили 0,4 мл 30 % раствора метафосфорной кислоты («Sigma-Aldrich», США) и центрифугировали образцы при 1000 g в течение 15 минут. В полученном супернатанте определяли концентрацию GSH. Содержание белково-связанного глутатиона представляли в нмоль/мг белка.

2.13 Определение концентрации SH-групп белков в опухолевых клетках линии P19

Предварительно полученный при приготовлении лизатов осадок, содержащий внутриклеточные белки, растворяли в 1 мл 1X растворе PBS (pH=7,4).

В реакционную смесь вносили 0,2 мл образца, 0,8 мл 0,01 М раствора фосфатного буфера (pH=7,0) и 0,2 мл забуференного раствора ДТНБ (0,4 мг/мл).

Измерение оптической плотности опытных проб осуществляли, используя спектрофотометр «СФ-2000» («ОКБ-Спектр», Россия) при длине волны 412 нм, против контрольной пробы, содержащей 0,2 мл дистиллированной воды.

Показатель, отражающий концентрацию свободных SH-групп белков в клетке, рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции ДТНБ (13600 $М^{-1}$ $см^{-1}$) и выражали в нмоль/мг белка [152].

2.14 Определение активности глутатионредуктазы в опухолевых клетках линии Р19

Активность глутатионредуктазы оценивали по НАДФН-зависимому восстановлению GSSG с дальнейшим его взаимодействием ДТНБ, приводящему к образованию ТНБ, водный раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм [271].

Состав смеси для изучения активности фермента: 0,1 мл лизата клеток в 1 мл 0,05 М раствора Na-фосфатного буфера (pH=7,4) с 1 мМ ЭДТА-Na; 100 мкл 11 мМ GSSG, 200 мкл 0,5 мМ НАДФН•H^+, 200 мкл 4 мМ ДТНБ. Экстинцию проб измеряли при длине волны 412 нм на спектрофотометре «СФ-2000» («ОКБ-Спектр», Россия). Активность фермента выражали в мкмоль/мин•мг белка.

2.15 Определение активности глутатионпероксидазы в опухолевых клетках линии Р19

Активность глутатионпероксидазы определяли по способности катализировать реакцию взаимодействия гидропероксидом т-бутила с GSH, который в последствии взаимодействовал с ДТНБ образованием ТНБ [13].

Состав смеси для изучения активности фермента: 0,2 мл лизата клеток в 0,73 мл сложного буфера (78 мг NaN_3, 100 мг GSH в 100 мл 0,1 М растворе трис-HCl буфера с 0,01 % ЭДТА-Na (pH=8,5)). После 10-минутной инкубации смеси при t=37 °С реакцию инициировали с помощью добавления 70 мкл 0,14 % раствора гидроперекиси трет-бутила («Sigma-Aldrich», США). После 5-минутной инкубации при t=37 °С реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 20 % раствора ТХУ. В контрольных пробах добавление раствора гидроперекиси после осаждения белка ТХУ. После 10-минтного центрифугирования при 1000 g, в полученном супернатанте определяли содержание GSH. Экстинцию проб измеряли на спектрофотометре «СФ-2000» («ОКБ-Спектр», Россия) при длине

волны 412 нм. Величину активности фермента рассчитывали с учетом разведений и выражали в мкмоль/мин•мг белка.

2.16 Определение содержания карбонильных производных белков в опухолевых клетках линии Р19

Концентрацию карбонильных производных белков определяли по их реакции взаимодействия с 2,4-динитрофенилгидразином (ДНФГ), продукт которой имеет максимум поглощения при длине волны 363 нм [1].

Для оценки спонтанной окислительной модификации белков использовали 0,1 мл лизата клеток и 0,9 мл 0,07 М раствора фосфатного буфера (pH=7,4), которые подвергали 15-минутной инкубации при t=37 °С и после добавляли 1 мл 0,01 М раствора 2,4-ДНФГ, растворённого в 2 М растворе HCl. В контрольные пробы вместо 2,4-ДНФГ вносили равный объем 2 М раствора HCl. Для осаждения белков использовали 1 мл 20 % раствора ТХУ. После 60-минутной инкубации при комнатной температуре, пробы центрифугировали в течение 15 минут при 1500 g. Затем проводили двух-кратное промывание полученного осадка смесью раствора этилового спирта и этилацетата для экстракции липидов и 2,4-ДНФГ, не вступившего во взаимодействие с карбонильными группами окисленных белков. Растворение полученного осадка осуществляли в 8 М растворе мочевины. Экстинцию проб измеряли на спектрофотометре «СФ-2000» («ОКБ-Спектр», Россия).

Содержание карбонильных производных белков рассчитывали с учетом разведений и коэффициента молярной экстинкции 2,4-ДНФ-гидразонов (22×10^{-3} $М^{-1}см^{-1}$). Результат выражали в нмоль/мг белка.

2.17 Оценка содержания ионов кальция в опухолевых клетках линии P19

Оценку концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме опухолевых клеток линии P19 проводили методом, основанным на определении интенсивности флуоресценции липофильного зонда Fluo 3 AM («Sigma-Aldrich», США), проникающего в клетку и связывающего ионы Ca^{2+} [259].

Для этого 200 мкл суспензии клеток (2×10^6 клеток/мл) дважды отмывали в 400 мкл раствора фосфатно-солевого буфера (pH=7,4). После чего клетки инкубировали 10 минут в темноте в растворе фосфатно-солевого буфера с добавлением зонда Fluo 3 AM в конечной концентрации 5 мкМ/1 мл пробы. Указанная концентрация зонда позволяла достичь оптимальных параметров связывания ионов Ca^{2+} в цитоплазме клетки. Пробы анализировали на проточном цитометре «FACSCanto II» («BD», США) с применением программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3. Оценивали параметры флуоресценции зонда Fluo 3 AM при длине волны 526 нм, результаты выражали в условных единицах (у.е.) (уровень свечения Fluo 3 AM на клетку).

2.18 Определение концентрации общего белка в опухолевых клетках линии P19

Содержание белка в клетках определяли по методу Бредфорда, основанном на взаимодействии аминокислотных остатков лизина и аргинина с красителем Кумасси голубым G-250 [44].

Состав смеси для определения содержания общего белка: 0,1 мл лизата клеток и 1 мл рабочего раствора Кумасси голубого G-250 («Sigma-Aldrich», США), приготовленного с использованием 96 % раствора этанола и 85 % раствора ортофосфорной кислоты («Sigma-Aldrich», США). После 3-минутной инкубации при комнатной температуре измеряли экстинцию проб на спектрофотометре «СФ-2000» («ОКБ-Спектр», Россия) при длине волны 595 нм против контроля.

Концентрацию общего белка в пробе выражали в мг/мл, используя калибровочный график стандартного раствора альбумина (1 мг/мл).

2.19 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных данных выполнялась в программе SPSS Statistics (версия 17.0).

Проверку на нормальность распределения полученных результатов проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Результаты статистической обработки количественных признаков представляли в формате медианы и квартилей (Me (Q_1-Q_3)). Достоверность различий между группами оценивали с использованием непараметрического критерия Крускалла-Уоллиса (для нескольких независимых выборок). В случае обнаружения статистически значимых различий между группами проводили попарный анализ с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Для оценки взаимосвязи между показателями рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Различия считались достоверными при уровне значимости (p) ниже 0,05 [2].

Глава 3. Результаты исследования

3.1 Параметры регуляции и реализации апоптоза, изменения состояния системы глутатиона и окислительной модификации белков в опухолевых клетках линии Р19 в условиях нормоксии и гипоксии

Формирование опухолевой прогрессии предполагает нестабильность генома, изменения экспрессии генов и метаболизма клетки, отражающиеся на способности ускользать от апоптотической формы гибели [64, 164, 221]. Важным регулятором направленности метаболических путей выступает напряжение кислорода внутри клетки. Основная роль кислорода сводится к участию в катализе цитохромоксидазы в качестве конечного акцептора для электронов ферментов дыхательной цепи митохондрий [154]. Особенностью опухолевых клеток является выживание в условиях гипоксии и ОС. Гипоксия способствует формированию ОС [182, 204, 232, 267]. Для определения редокс-зависимых молекулярных механизмов нарушения апоптоза выполнили оценку состояния системы глутатиона, окислительной модификации белков, регуляции и реализации программированной гибели опухолевых клеток линии Р19 при нормоксии и гипоксии.

С целью контролирования условий эксперимента нами было проведено измерение концентрации кислорода в среде культивирования опухолевых клеток линии Р19 оксиметром (Таблица 1).

Влияние сниженного напряжения кислорода на жизнеспособность клеток опухолевой линии Р19 была оценена в МТТ- и аннексиновом тесте. Результаты представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 1 – Концентрация кислорода в инкубационной среде опухолевых клеток линии P19, культивированных в условиях нормоксии и при моделировании гипоксии, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Растворенный кислород, мг/л
1	Нормоксия	5	7,08 (6,91-7,69)
2	Гипоксия	5	2,76 (2,55-3,15) p_{1-2}<0,05

Примечание – Здесь и в таблицах 2-19: p_{n-m} – уровень статистической значимости различий между соответствующими группами сравнения; n – размер выборки

Таблица 2 – Количество МТТ-положительных опухолевых клеток линии P19, культивированных в условиях нормоксии и при моделировании гипоксии, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	МТТ-положительные клетки, %
1	Нормоксия	5	98 (97-100)
2	Гипоксия	5	75 (70-80) p_{1-2}<0,05

Нами было отмечено статистически значимое снижение на 23,47 % (p<0,05) количества жизнеспособных опухолевых клеток линии P19 в МТТ-тесте культивированных в условиях гипоксии по сравнению с данными, полученными при нормальном напряжении кислорода в среде инкубации (Таблица 2).

Таблица 3 – Количество аннексин-положительных опухолевых клеток линии P19, культивированных в условиях нормоксии и при моделировании гипоксии, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Аннексин-положительные клетки, %
1	Нормоксия	6	2,65 (2,20-3,40)
2	Гипоксия	6	10,75 (4,50-10,90) p_{1-2}<0,05

Оценка количества апоптотически измененных опухолевых клеток линии P19 показала статистически значимое увеличение аннексин-положительных клеток на 305,66 % ($p<0,05$) культивированных в условиях гипоксии по сравнению с результатами, полученных в условиях нормоксии (Таблица 3).

Для изучения роли митохондриального пути запуска апоптоза в опухолевых клетках линии P19 при нормальном и сниженном напряжении кислорода, нами проведена оценка изменения трансмембранного потенциала митохондрий клеток и внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+}. Так, моделирование гипоксии приводило к статистически значимому увеличению процента опухолевых клеток линии P19 со сниженным митохондриальным потенциалом на 205,88 % ($p<0,05$) и содержания ионов Ca^{2+} на 30,61 % ($p<0,05$) по сравнению с показателями, полученными при нормоксии, что указывает на активацию митохондриального пути апоптоза опухолевых клеток при гипоксии (Таблица 4).

Таблица 4 – Количество клеток со сниженным митохондриальным потенциалом и содержание ионов Ca^{2+} в опухолевых клетках линии P19 культивированных в условиях нормоксии и при моделировании гипоксии, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Количество клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, %	Внутриклеточное содержание ионов Ca^{2+}, у.е.
1	Нормоксия	5	3,4 (3,2-3,5)	7,84 (7,78-7,88)
2	Гипоксия	5	10,4 (10,4-10,6) $p_{1-2}<0,05$	10,24 (10,10-10,36) $p_{1-2}<0,05$

Экспрессия молекул на цитоплазматической мембране, участвующих в реализации рецепторного пути апоптоза (TNF RI и Fas-рецептор) у различных типов клеток подвержена строгому контролю, поскольку её повышение делает

клетки высокочувствительными к запуску апоптоза соответствующими лигандами. Результаты проточной цитометрии свидетельствовали о сопоставимом числе TNF RI- и Fas-положительных опухолевых клеток линии P19, инкубированных в условиях гипоксии, относительно количества клеток культивированных при нормоксии (Таблица 5).

Таблица 5 – Содержание TNF RI- и Fas-положительных опухолевых клеток линии P19, культивированных в условиях нормоксии и при моделировании гипоксии, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Содержание TNF RI-положительных клеток, %	Содержание Fas-положительных клеток, %
1	Нормоксия	5	0,8 (0,7-0,9)	0,9 (0,7-0,9)
2	Гипоксия	5	1,4 (1,3-1,5)	1,0 (0,9-1,1)

Моделирование гипоксии в культуре опухолевых клеток линии P19 приводило к формированию ОС и сопровождалось статистически значимым увеличением концентрации АФК на 84,61 % ($p<0,05$) и гидроксильного радикала на 643,44 % ($p<0,05$) относительно данных, полученных в условиях нормоксии (Таблица 6).

Таблица 6 – Содержание активных форм кислорода и ОН-радикала в опухолевых клетках линии P19, культивированных в условиях нормоксии и при моделировании гипоксии, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Концентрация активных форм кислорода, у.е.	Содержание ОН-радикала, нмоль/мг белка
1	Нормоксия	5	10,33 (10,23-10,42)	3,66 (3,32-9,72)
2	Гипоксия	5	19,07 (18,96-19,29) $p_{1-2}<0,05$	27,21 (23,56-29,93) $p_{1-2}<0,05$

Активные формы кислорода способны принимать участие в передаче внутриклеточного сигнала посредством модуляции активности белков-мишеней

(ферменты, включая киназы и фосфатазы, рецепторы, белки-транспортеры и факторы транскрипции) за счет обратимого окисления тиоловых групп в их составе [147]. Однако помимо регуляторной функции в клетке АФК могут оказывать повреждающее воздействие в концентрациях, превышающих адаптивные резервы системы антиоксидантной защиты [223]. Важнейшая роль в повреждающем эффекте принадлежит гидроксильному радикалу, как наиболее реакционно-способному представителю АФК [91].

Внутриклеточная система антиоксидантной защиты способна поддерживать концентрацию АФК в определенном диапазоне. Дисбаланс между прооксидантами и антиоксидантами может приводить к формированию ОС, нарушению редокс-гомеостаза и запуску апоптоза.

Одной из ведущих антиоксидантных систем инактивирующих АФК является система глутатиона. В эукариотических клетках глутатион занимает особое место, поскольку его внутриклеточная концентрация может достигать высоких значений [79]. Основным источником данного трипептида для клеток является его АТФ-зависимый синтез с участием ферментов: γ-глутамилцистеинсинтетазы и глутатионсинтетазы [100]. Скорость всего процесса лимитируется образованием γ-глутамилцистеина из соответствующих аминокислот, регулируется доступностью L-цистеина и концентрацией конечного продукта в клетке [128].

В условиях гипоксии в клетках опухолевой линии P19 нами было показано статистически значимое снижение содержания общего глутатиона на 18,59 % ($p<0,05$) и GSH на 21,02 % ($p<0,05$) на фоне сопоставимого значения концентрации GSSG относительно результатов, полученных при нормальном напряжении кислорода (Таблица 7).

Показателем, отражающим редокс-баланс клетки является отношение концентраций восстановленной формы глутатиона к окисленной (GSH/GSSG). Однако, помимо компонентов системы глутатиона важную роль в поддержании редокс-гомеостаза играют тиоловые группы боковых радикалов аминокислот

внутриклеточных белков. Моделирование гипоксии в культуре опухолевых клеток линии P19 приводило к изменению редокс-баланса, на что указывало статистически значимое снижение величины соотношения GSH/GSSG на 44,74 % ($p<0,05$) и концентрации восстановленных SH-групп остатков цистеина, входящих в состав белков, на 54,45 % ($p<0,05$) относительно показателей, полученных в условиях нормального напряжения кислорода (Таблица 8).

Таблица 7 – Содержание общего, восстановленного и окисленного глутатиона в опухолевых клетках линии P19, культивированных в условиях нормоксии и при моделировании гипоксии, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Общий глутатион, нмоль/мг белка	Восстановленный глутатион, нмоль/мг белка	Окисленный глутатион, нмоль/мг белка
1	Нормоксия	5	5,97 (5,80-6,31)	5,66 (5,55-5,91)	0,31 (0,30-0,41)
2	Гипоксия	5	4,86 (4,74-5,03) $p_{1-2}<0,05$	4,47 (4,40-4,58) $p_{1-2}<0,05$	0,43 (0,39-0,45)

Таблица 8 – Величина соотношения восстановленной формы глутатиона к окисленной и содержание SH-групп белков в опухолевых клетках линии P19, культивированных в условиях нормоксии и при моделировании гипоксии, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Величина соотношения GSH/GSSG	Содержание SH-групп белков, нмоль/мг белка
1	Нормоксия	5	18,44 (13,15-20,29)	19,23 (18,94-21,57)
2	Гипоксия	5	10,19 (9,88-11,35) $p_{1-2}<0,05$	8,76 (7,83-10,55) $p_{1-2}<0,05$

Кроме этого, в опухолевых клетках линии P19, инкубированных в условиях гипоксии, нами было установлено статистически значимое увеличение активности глутатионредуктазы на 70,31 % ($p<0,05$) на фоне значимого снижения активности глутатионпероксидазы на 24,63 % ($p<0,05$) по сравнению с результатами, полученными при нормоксии (Таблица 9).

Таблица 9 – Активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в опухолевых клетках линии Р19, культивированных в условиях нормоксии и при моделировании гипоксии, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Активность глутатионредуктазы, мкмоль/мин•мг белка	Активность глутатионпероксидазы, мкмоль/мин•мг белка
1	Нормоксия	5	3,57 (3,33-3,90)	1,34 (1,25-1,40)
2	Гипоксия	5	6,08 (5,62-10,20) $p_{1-2}<0,05$	1,01 (0,95-1,03) $p_{1-2}<0,05$

Зафиксированное нами повышение активности глутатионредуктазы в опухолевых клетках линии Р19 при гипоксии не смогло обеспечить достаточное содержание восстановленного глутатиона.

Маркером необратимой окислительной модификации белков являются карбонильные производные протеинов. В отличие от обратимого и регулируемого процесса глутатионилирования, образование карбонильных производных белков является необратимым и часто рассматривается как показатель свободно-радикального окисления [37]. При моделировании гипоксии в опухолевых клетках линии Р19 нами было установлено статистически значимое увеличение концентрации карбонильных производных белков на 117,31 % ($p<0,05$) и белково-связанного глутатиона на 246,67 % ($p<0,05$) по сравнению с результатами, полученными при нормоксии (Таблица 10).

Таблица 10 – Содержание белково-связанного глутатиона и карбонильных производных белков в опухолевых клетках линии Р19, культивированных в условиях нормоксии и при моделировании гипоксии, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Содержание карбонильных производных белков, нмоль/мг белка	Содержание белково-связанного глутатиона, нмоль/мг белка
1	Нормоксия	5	4,68 (4,63-4,73)	0,60 (0,58-0,74)
2	Гипоксия	5	10,17 (8,92-10,39) $p_{1-2}<0,05$	2,08 (1,95-2,19) $p_{1-2}<0,05$

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о формировании ОС, дисбалансе системы глутатиона и активации апоптотической гибели опухолевых клеток линии Р19 в условиях моделирования гипоксии. При этом формирование ОС способствует окислительной модификации белков, что, в свою очередь, вызывает изменение метаболизма и функций клетки. Зафиксированное нами в условиях гипоксии увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} возникало, вероятно, за счет окислительной модификации тиоловых групп остатков цистеина в Ca^{2+}-АТФазе. Снижение величины соотношения GSH/GSSG в опухолевых клетках линии Р19 при моделировании гипоксии на фоне сопоставимой концентрации GSSG относительно условий нормоксии способствовало, на наш взгляд, увеличению содержания белково-связанного глутатиона, т.е. глутатионилированию протеинов. В тоже время сформированный ОС в опухолевых клетках линии Р19, которые были подвергнуты инкубации при сниженном напряжении кислорода, сопровождался активацией карбонилирования белков.

Все вышеизложенное определяет актуальность изучения реализации и регуляции апоптотической гибели опухолевых клеток линии Р19, особенностей изменения состояния системы глутатиона, концентрации вторичного посредника внутриклеточной передачи сигнала (ионов Ca^{2+}) и окислительной модификации белков в условиях редокс-модуляции гомеостаза этих клеток при нормальном и сниженном напряжении кислорода.

3.2 Влияние редокс-модуляторов на регуляцию и реализацию апоптоза, состояние системы глутатиона, окислительную модификацию белков в опухолевых клетках линии Р19 при нормоксии и гипоксии

Участие белков в редокс-регуляции метаболизма клеток определяется наличием SH-групп цистеина, карбонильных групп боковых радикалов глутаминовой и аспарагиновой аминокислот в структуре протеинов. Изменения

степени окисления атома серы и возможность вступления в реакцию образования дисульфидных сшивок рассматриваются как функциональные посттрансляционные модификации белков. Регуляция метаболизма клетки может обеспечиваться глутатионилированием и карбонилированием белков, ответственных за контроль клеточного цикла, экспрессию генов, внутриклеточную передачу сигнала и ферментативный катализ.

В таблице 11 представлены данные о влиянии модуляторов редокс-гомеостаза на жизнеспособность клеток опухолевой линии P19 при нормоксии в МТТ-тесте. Результаты этого теста указывали на выраженное цитотоксическое действие NEM, блокатора SH-групп пептидов и белков, на опухолевые клетки линии P19, культивируемые в условиях нормоксии. Так, количество жизнеспособных клеток при добавлении NEM статистически значимо уменьшалось на 85,71 % ($p<0,05$) относительно показателя, полученного в условиях нормоксии. Воздействие NAC, предшественника синтеза глутатиона, или DTE, протектора SH-групп пептидов и белков, при нормоксии приводило к статистически значимому увеличению доли нежизнеспособных клеток на 15,31 % и 21,43 % ($p<0,05$), соответственно, по сравнению с результатами, полученными при нормоксии (Таблица 11).

Условия гипоксии способствуют усилению ОС в опухолевых клетках. Для изучения особенностей регуляции и реализации апоптотической гибели, а также молекулярных механизмов опосредующих этот процесс в условиях гипоксии были применены редокс-модуляторы.

При изучении влияния модуляторов редокс-гомеостаза на процент жизнеспособных клеток в МТТ-тесте опухолевой линии P19 в условиях гипоксии было выявлено статистически значимое снижение показателя на 78,67 % ($p<0,05$) при дополнительном внесении в среду инкубации NEM и статистически значимое увеличение показателя – NAC на 12,00 % ($p<0,05$) относительно значений, полученных при гипоксии (Таблица 11). Воздействие DTE на опухолевые клетки линии P19 в условиях гипоксии не изменяло ($p>0,05$) их жизнеспособность по

сравнению результатом, полученным в условиях гипоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Таблица 11).

Таблица 11 – Количество МТТ-положительных опухолевых клеток линии Р19, культивированных в условиях нормоксии, гипоксии и дополнительном добавлении NEM или NAC, или DTE, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	МТТ-положительные клетки, %
1	Нормоксия	5	98 (97-100)
2	Нормоксия+NEM	5	14 (12-21) $p_{1-2}<0,05$
3	Нормоксия+NAC	5	83 (81-84) $p_{1-3}<0,05$
4	Нормоксия+DTE	5	77 (77-83) $p_{1-4}<0,05$
5	Гипоксия	5	75 (70-80) $p_{1-5}<0,05$
6	Гипоксия+NEM	5	16 (12-20) $p_{5-6}<0,05$
7	Гипоксия+NAC	5	84 (82-85) $p_{5-7}<0,05$
8	Гипоксия+DTE	5	70 (67-71) $p_{4-8}<0,05$

Примечание – Здесь и в таблицах 12-19: NEM – N-этилмалеимид, NAC – N-ацетилцистеин, DTE – 1,4-дитиоэритритол

Помимо этого, при сравнении процента жизнеспособных клеток опухолевой линии Р19 в МТТ-тесте в условиях гипоксии при добавлении в среду инкубации DTE было выявлено статистически значимое снижение показателя на 9,09 % ($p<0,05$) относительно значения, полученного при нормоксии, культивированных в присутствии DTE (Таблица 11).

При изучении реализации апоптотической гибели опухолевых клеток линии Р19 в условиях нормоксии нами было зафиксировано статистически значимое увеличение количества аннексин-позитивных клеток при добавлении блокатора SH-групп пептидов и белков (NEM) на 3498,11 % ($p<0,05$) или предшественника синтеза глутатиона (NAC) на 69,81 % ($p<0,05$) относительно данных, полученных в условиях нормоксии (Таблица 12). Добавление в среду инкубирования протектора SH-групп пептидов и белков (DTE) при нормальном

напряжении кислорода не вызывало активацию апоптотического типа гибели опухолевых клеток линии P19 (Таблица 12). В работе S. Qanungo и соавторов показано, что предшественник глутатиона может оказывать свой проапоптотический эффект за счет подавления NF-κB-зависимого сигнального пути [103].

Таблица 12 – Количество аннексин-положительных опухолевых клеток линии P19, культивированных в условиях нормоксии, гипоксии и дополнительном добавлении NEM или NAC, или DTE, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Аннексин-положительные клетки, %
1	Нормоксия	6	2,65 (2,20-3,40)
2	Нормоксия+NEM	6	95,35 (92,70-95,60) $p_{1-2}<0,05$
3	Нормоксия+NAC	6	4,50 (3,70-5,20) $p_{1-3}<0,05$
4	Нормоксия+DTE	6	3,20 (3,20-4,30)
5	Гипоксия	6	10,75 (4,50-10,90) $p_{1-5}<0,05$
6	Гипоксия+NEM	6	98,05 (97,70-98,40) $p_{5-6}<0,05$; $p_{2-6}<0,05$
7	Гипоксия+NAC	6	7,65 (7,00-8,60) $p_{3-7}<0,05$
8	Гипоксия+DTE	6	5,50 (4,70-6,70) $p_{4-8}<0,05$

В опухолевых клетках линии P19 при дополнительном внесении в среду инкубации NEM в условиях гипоксии отмечалось статистически значимое увеличение процента аннексин-положительных клеток на 812,09 % ($p<0,05$) по сравнению с результатом, полученным при гипоксии (Таблица 12). Воздействие NAC или DTE на опухолевые клетки линии P19 в условиях гипоксии не вызывало статистически значимого изменения процента аннексин-положительных клеток по сравнению с показателем, полученным в условиях гипоксии без воздействия указанных редокс-модуляторов (Таблица 12).

Моделирование гипоксии в опухолевых клетках линии P19 и добавление NEM вызывало статистически значимое увеличение процента аннексин-положительных клеток на 2,83 % ($p<0,05$), NAC – 70,00 % ($p<0,05$), DTE – 71,88 %

($p<0,05$) относительно значений, полученных при нормоксии и действии соответствующего редокс-модулятора (Таблица 12).

Для оценки значения митохондриального пути запуска апоптоза опухолевых клеток линии P19 при нормоксии и гипоксии в условиях модулирования редокс-статуса проведено определение величины митохондриального потенциала. Результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Количество клеток со сниженным митохондриальным потенциалом и содержание ионов Ca^{2+} в опухолевых клетках линии P19, культивированных в условиях нормоксии, гипоксии и дополнительном добавлении NEM или NAC, или DTE, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Количество клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, %	Внутриклеточное содержание ионов Ca^{2+}, у.е.
1	Нормоксия	5	3,40 (3,20-3,50)	7,84 (7,78-7,88)
2	Нормоксия +NEM	5	93,10 (92,5-96,2) $p_{1-2}<0,05$	29,04 (28,91-29,10) $p_{1-2}<0,05$
3	Нормоксия +NAC	5	5,80 (5,70-5,90) $p_{1-3}<0,05$	8,03 (7,96-8,04) $p_{1-3}<0,05$
4	Нормоксия +DTE	5	4,00 (3,90-4,10) $p_{1-4}<0,05$	9,82 (9,63-9,88) $p_{1-4}<0,05$
5	Гипоксия	5	10,40 (10,40-10,60) $p_{1-5}<0,05$	10,24 (10,10-10,36) $p_{1-5}<0,05$
6	Гипоксия+ NEM	5	91,20 (90,80-92,00) $p_{5-6}<0,05$	30,23 (29,47-30,39) $p_{5-6}<0,05$; $p_{2-6}<0,05$
7	Гипоксия+ NAC	5	3,10 (3,00-3,20) $p_{5-7}<0,05$; $p_{3-7}<0,05$	9,74 (9,72-9,75) $p_{5-7}<0,05$; $p_{3-7}<0,05$
8	Гипоксия+ DTE	5	2,00 (2,00-2,10) $p_{5-8}<0,05$; $p_{4-8}<0,05$	9,48 (9,43-9,49) $p_{5-8}<0,05$; $p_{4-8}<0,05$

Добавление NEM при нормоксии приводило к статистически значимому увеличению количества опухолевых клеток линии P19 со сниженным митохондриальным потенциалом на 2638,24 % ($p<0,05$) относительно показателя, полученного при нормальном напряжении кислорода, что свидетельствовало о повышении проницаемости внешней митохондриальной мембраны и снижении трансмембранного потенциала (Таблица 13). Статистически значимое увеличение процента опухолевых клеток линии P19, имеющих сниженный митохондриальный потенциал, происходило также в условиях нормоксии под воздействием предшественника синтеза глутатиона (NAC) или протектора SH-групп пептидов и белков (DTE) на 70,59 % ($p<0,05$) и 17,65 % ($p<0,05$), соответственно, относительно результатов, зафиксированных при нормоксии (Таблица 13).

При изучении реализации апоптотической формы гибели опухолевых клеток линии P19 в условиях гипоксии нами было показано статистически значимое увеличение количества клеток со сниженным митохондриальным потенциалом при добавлении NEM на 776,92 % ($p<0,05$), а при добавлении DTE или NAC статистически значимое снижение изучаемого параметра на 80,77 % ($p<0,05$) и 70,19 % ($p<0,05$), соответственно, относительно результата, полученного при гипоксии (Таблица 13).

Моделирование гипоксии в опухолевых клетках линии P19 и добавление NAC вызывало статистически значимое снижение процента клеток со сниженным митохондриальным потенциалом на 46,55 % ($p<0,05$), а DTE – 50,00 % ($p<0,05$) относительно значений, полученных при нормоксии и действии соответствующего редокс-модулятора (Таблица 13).

Запуск митохондриального пути апоптотической гибели напрямую зависит от внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+}. В настоящее время считается, что основным механизмом удаления ионов Ca^{2+} из цитоплазмы является его выведение в межклеточное пространство против градиента концентрации, следовательно, внутриклеточное содержание данного иона отражает работу ион-

транспортирующих систем и в первую очередь Ca^{2+}-АТФазы, расположенной на плазмолемме.

В опухолевых клетках линии P19 при нормоксии и дополнительном добавлении в среду инкубирования NEM нами было зарегистрированно статистически значимое увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} на 270,41 % ($p<0,05$), при внесении NAC – 2,42 % ($p<0,05$) или DTE – 25,26 % ($p<0,05$) относительно значений, полученных при нормальном напряжении кислорода (Таблица 13).

В условиях гипоксии добавление в инкубационную среду NEM приводило к статистически значимому увеличению концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме опухолевых клеток линии P19 на 195,21 % ($p<0,05$) относительно показателя, полученного при гипоксии (Таблица 13). Воздействие NAC или DTE на клетки опухолевой линии P19 при сниженном напряжении кислорода сопровождалось небольшим, но достоверным снижением изучаемого параметра на 4,88 % ($p<0,05$) и 7,42 % ($p<0,05$), соответственно, относительно результата, полученнего при гипоксии (Таблица 13).

В опухолевых клетках линии P19 в условиях гипоксии и дополнительном добавлении NEM нами было зафиксировано статистически значимое увеличение содержания ионов Ca^{2+} на 4,10 % ($p<0,05$), NAC – 21,30 % ($p<0,05$), а при внесении DTE – статистически значимое снижение концентрации ионов Ca^{2+} на 3,46 % ($p<0,05$) относительно значений, полученных при нормоксии и действии соответствующего редокс-модулятора (Таблица 13).

Таким образом, поскольку среди всех групп, в которых опухолевые клетки линии P19 находились под воздействием гипоксии, внутриклеточная концентрация ионов Ca^{2+} была минимальной в группе с добавлением DTE или NAC, можно сделать предположение о том, что компоненты системы глутатиона, обеспечивающие защиту SH-групп в составе молекул Ca^{2+}-АТФазы, могут влиять на активность фермента и модулировать функцию сигнальных каскадов.

При изучении рецептор-опосредованной реализации апоптотической гибели в условиях нормоксии нами было установлено статистически значимое увеличение процента опухолевых клеток линии P19, несущих на своей поверхности рецептор TNF RI: при дополнительном добавлении NEM на 650,00 % ($p<0,05$), DTE – 150,00 % ($p<0,05$) относительно значений, полученных при нормальном напряжении кислорода (Таблица 14). Добавление предшественника синтеза глутатиона (NAC) в условиях нормоксии не привело к статистически значимым изменениям уровня экспрессии TNF RI опухолевых клеток линии P19 относительно результатов, полученных при нормоксии (Таблица 14).

Таблица 14 – Содержание TNF RI- и Fas-положительных опухолевых клеток линии P19, культивированных в условиях нормоксии, гипоксии и дополнительном добавлении NEM или NAC, или DTE, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Содержание TNF RI-положительных клеток, %	Содержание Fas-положительных клеток, %
1	Нормоксия	5	0,8 (0,7-0,9)	0,9 (0,7-0,9)
2	Нормоксия+ NEM	5	6,0 (5,6-7,4) $p_{1-2}<0,05$	21,9 (21,4-23,5) $p_{1-2}<0,05$
3	Нормоксия+ NAC	5	1,0 (0,9-1,0)	1,3 (1,2-1,3) $p_{1-3}<0,05$
4	Нормоксия+ DTE	5	2,0 (1,7-2,2) $p_{1-4}<0,05$	1,4 (1,2-1,5) $p_{1-4}<0,05$
5	Гипоксия	5	1,4 (1,3-1,5)	1,0 (0,9-1,1)
6	Гипоксия+ NEM	5	4,1 (4,0-4,5) $p_{5-6}<0,05$	15,5 (12,8-15,7) $p_{5-6}<0,05$
7	Гипоксия+ NAC	5	0,9 (0,8-1,0)	1,1 (1,0-1,2)
8	Гипоксия+ DTE	5	1,1 (1,0-1,2) $p_{4-8}<0,05$	0,9 (0,8-1,2)

Помимо этого, в условиях нормального напряжения кислорода в среде инкубации опухолевых клеток линии P19, нами было установлено статистически значимое увеличение процента Fas-позитивных клеток при дополнительном добавлении NEM на 2333,33 % ($p<0,05$), DTE – 55,56 % ($p<0,05$) или NAC – 44,44 % ($p<0,05$) относительно значений, полученных при нормоксии (Таблица 14).

В условиях гипоксии нами было зафиксировано статистически значимое увеличение числа TNF RI- и Fas-положительных опухолевых клеток линии P19 на 192,86 % ($p<0,05$) и 1450,00 % ($p<0,05$), соответственно, при дополнительном добавлении в среду инкубации NEM относительно результатов, полученных при гипоксии (Таблица 14).

Добавление NAC или DTE в среду инкубации опухолевых клеток линии P19 в условиях гипоксии сопровождалось сопоставимым уровнем экспрессии TNF RI и Fas-рецепторов по сравнению с показателями, полученными в условиях гипоксии без воздействия указанных редокс-модуляторов (Таблица 14).

Моделирование гипоксии в опухолевых клетках линии P19 и добавление DTE вызывало статистически значимое снижение уровня экспрессии TNF RI на 45,00 % ($p<0,05$) относительно показателя, полученного при нормоксии и действии DTE (Таблица 14).

Таким образом, значительное возрастание количества TNF RI и Fas-положительных опухолевых клеток линии P19 при воздействии блокатора SH-групп пептидов и белков (NEM) указывает на важную роль изменений редокс-гомеостаза в реализации программированной гибели клеток по рецепторному пути в условиях моделирования гипоксии.

Активация апоптотической гибели опухолевых клеток линии P19 при редокс-модулировании в условиях нормоксии была сопряжена с изменением концентрации АФК. Так, добавление NEM в среду инкубации опухолевых клеток линии P19 при нормоксии приводило к статистически значимому снижению содержания АФК на 59,73 % ($p<0,05$), в то время как содержание гидроксильного

радикала было статистически значимо увеличено на 772,95 % ($p<0,05$) относительно значений, полученных при нормоксии (Таблица 15). Основной причиной данного эффекта может являться вызываемое NEM изменение активности внутриклеточных эстераз, осуществляющих деацетилирование ДХФ-ДА. Согласно предположению ряда авторов, такие изменения могут вносить значительный вклад в интенсивность флуоресцентного сигнала [101].

Таблица 15 – Содержание активных форм кислорода и ОН-радикала в опухолевых клетках линии Р19, культивированных в условиях нормоксии, гипоксии и дополнительном добавлении NEM или NAC, или DTE, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Концентрация активных форм кислорода, у.е.	Содержание ОН-радикала, нмоль/мг белка
1	Нормоксия	5	10,33 (10,23-10,42)	3,66 (3,32-9,72)
2	Нормоксия +NEM	5	4,16 (3,64-4,80) $p_{1-2}<0,05$	31,95 (20,26-35,83) $p_{1-2}<0,05$
3	Нормоксия +NAC	5	10,08 (9,86-10,10)	10,30 (9,10-12,96)
4	Нормоксия +DTE	5	8,25 (8,17-8,57) $p_{1-4}<0,05$	16,33 (12,55-18,08) $p_{1-4}<0,05$
5	Гипоксия	5	19,07 (18,96-19,29) $p_{1-5}<0,05$	27,21 (23,56-29,93) $p_{1-5}<0,05$
6	Гипоксия+ NEM	5	6,39 (5,33-6,81) $p_{5-6}<0,05$; $p_{2-6}<0,05$	29,94 (29,42-32,20)
7	Гипоксия+ NAC	5	17,94 (17,88-18,06) $p_{5-7}<0,05$; $p_{3-7}<0,05$	31,53 (30,76-31,53) $p_{3-7}<0,05$
8	Гипоксия+ DTE	5	11,83 (11,61-12,11) $p_{5-8}<0,05$; $p_{4-8}<0,05$	10,70 (8,93-11,32) $p_{5-8}<0,05$

Аналогичная динамика показателей была выявлена в опухолевых клетках линии Р19 при нормоксии и дополнительном добавлении DTE – статистически

значимое снижение содержания АФК на 20,14 % ($p<0,05$) и увеличение концентрации гидроксильного радикала – 346,17 % ($p<0,05$) относительно значений, полученных при нормальном напряжении кислорода (Таблица 15).

Добавление NAC в среду инкубирования опухолевых клеток линии P19, находящихся в условиях нормального напряжения кислорода, не приводило к статистически значимому изменению концентрации АФК и гидроксильного радикала ($p>0,05$) относительно значений, полученных при нормоксии (Таблица 15).

Анализируя данные по влиянию редокс-модуляторов в условиях сниженного напряжения кислорода в инкубационной среде опухолевых клеток линии P19 на изменение внутриклеточного содержания АФК и гидроксильного радикала, нами было выявлено снижение изучамых параметров. Так, воздействие NEM сопровождалось статистически значимым снижением концентрации АФК на 66,49 % ($p<0,05$), DTE – 37,97 % ($p<0,05$), NAC – 5,93 % ($p<0,05$) по сравнению с данными, полученными при гипоксии (Таблица 15).

В опухолевых клетках линии P19 в условиях гипоксии и дополнительном добавлении NEM нами было зафиксировано статистически значимое увеличение внутриклеточного содержания АФК на 53,61 % ($p<0,05$), NAC – 77,98 % ($p<0,05$), а DTE – 43,39 % ($p<0,05$) относительно значений, полученных при нормоксии и действии соответствующего редокс-модулятора (Таблица 15).

В условиях гипоксии в опухолевых клетках линии P19 статистически значимое снижение содержания гидроксильного радикала было установлено только при дополнительном добавлении в среду инкубации DTE на 60,68 % ($p<0,05$) относительно результата, зафиксированного при гипоксии (Таблица 15). Однако воздействие NEM или NAC не вызывало статистически значимого изменения изучаемого параметра относительно показателя, полученного в условиях гипоксии без воздействия указанных редокс-модуляторов (Таблица 15). Вероятнее всего, это может быть следствием уменьшения концентрации

кислорода и снижением функционирования ферментов цепи переноса электронов в митохондриях опухолевых клеток линии P19.

Моделирование гипоксии в опухолевых клетках линии P19 и добавление NAC вызывало статистически значимое увеличение содержания гидроксильного радикала на 206,12 % ($p<0,05$) по сравнению с показателем, полученном при нормоксии и действии NAC (Таблица 15).

Биологические эффекты АФК разнообразны, но при оценке повреждающего воздействия на клетки особое внимание отводится наиболее реакционно-способному их представителю – гидроксильному радикалу. Поскольку образование гидроксильного радикала зависит от присутствия ионов металлов с переменной валентностью, в частности, железа, причиной возрастания его содержания может служить изменение концентрации данных ионов. Таким образом, наши данные косвенно подтверждают предположения ряда авторов о возможности разработки новых подходов в управлении ОС в клетке основанном на формировании хелатных комплексов с ионами железа [106].

Повышение продукции АФК было сопряжено с увеличением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+}, играющих важную роль в регуляции программированной гибели клеток. Сигнальные системы с участием ионов Ca^{2+} регулируют многие внутриклеточные процессы, в том числе, транскрипцию генов. В ответ на широкое разнообразие воздействий в большинстве типов клеток происходит увеличение ионов Ca^{2+}. При этом имеет значение не только увеличение содержания ионов Ca^{2+}, но и продолжительность таких изменений [53].

К механизмам АФК-индуцированной модификации ион-транспортирующих систем относятся окисление сульфгидрильных групп ион-транспортирующих белков, перекисное окисление липидов мембран, ингибирование регуляторных ферментов, связанных с мембранами, нарушение окислительного фосфорилирования и снижение содержания АТФ в клетке. Нарушения работы ион-транспортирующих механизмов приводят к дисбалансу

ионного гомеостаза клеток, включая содержание ионов Ca^{2+}. По современным данным АФК могут индуцировать повышение концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитоплазме за счет его высвобождения из внутриклеточных депо и изменение функционирования транспортных систем, отвечающих в норме за его удаление. Дисбаланс содержания ионов Ca^{2+}, в свою очередь, вызывает изменение функции митохондрий, приводящее к активации апоптоза [178]. Таким образом, повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} можно рассматривать, как неотъемлемый признак патологических процессов, ассоциированных с формированием ОС и нарушением регуляции апоптоза.

Контроль над концентрацией АФК важен, поскольку вызываемые ими клеточные дисфункции вносят весомый вклад в развитие многих заболеваний. Важную роль в поддержании редокс-статуса клеток играет система глутатиона. В клетках данный трипептид является антиоксидантом, связывая ионы металлов с переменной валентностью, препятствуя протеканию реакции Фентона [205]. В настоящее время также показано, что компоненты системы глутатиона могут участвовать в регуляции процессов репликации и транскрипции ДНК. Избыток глутатиона может сказываться на активности факторов транскрипции, например NF-κB, препятствуя их связыванию с молекулой ДНК [103].

В условиях нормоксии в опухолевых клетках линии P19 внесение в среду инкубации блокатора тиоловых групп пептидов и белков (NEM) приводило к статистически значимому снижению концентрации общего глутатиона на 67,84 % ($p<0,05$), добавление восстановителя тиоловых групп пептидов и белков (DTE) сопровождалось статистически значимым увеличением изучаемого показателя на 58,29 % ($p<0,05$), дополнительное воздействие предшественника синтеза глутатиона (NAC) не вызывало значимых изменений содержания метаболита относительно значений, полученных при нормоксии (Таблица 16).

В условиях нормоксии ни один из исследуемых модуляторов редокс-статуса не вызывал статистически значимого изменения концентрации GSSG в

опухолевых клетках линии P19 ($p>0,05$) по сравнению со значением содержания метаболита, полученном при нормальном напряжении кислорода (Таблица 16).

Таблица 16 – Содержание общего, восстановленного и окисленного глутатиона в опухолевых клетках линии P19, культивированных в условиях нормоксии, гипоксии и дополнительном добавлении NEM или NAC, или DTE, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Общий глутатион, нмоль/мг белка	Восстановленный глутатион, нмоль/мг белка	Окисленный глутатион, нмоль/мг белка
1	Нормоксия	5	5,97 (5,80-6,31)	5,66 (5,55-5,91)	0,31 (0,30-0,41)
2	Нормоксия +NEM	5	1,92 (1,65-2,11) $p_{1-2}<0,05$	1,33 (1,05-1,62) $p_{1-2}<0,05$	0,61 (0,30-0,88)
3	Нормоксия +NAC	5	6,84 (5,91-7,05)	6,40 (5,36-6,67)	0,44 (0,39-0,55)
4	Нормоксия +DTE	5	9,45 (8,63-9,72) $p_{1-4}<0,05$	9,07 (7,84-9,34) $p_{1-4}<0,05$	0,38 (0,38-0,59)
5	Гипоксия	5	4,86 (4,74-5,03) $p_{1-5}<0,05$	4,47 (4,40-4,58) $p_{1-5}<0,05$	0,43 (0,39-0,45)
6	Гипоксия+ NEM	5	1,99 (1,40-2,33) $p_{5-6}<0,05$	1,30 (0,67-1,88) $p_{5-6}<0,05$	0,69 (0,50-0,72) $p_{5-6}<0,05$
7	Гипоксия+ NAC	5	5,87 (5,63-6,08) $p_{5-7}<0,05$	5,27 (3,76-5,74)	0,53 (0,36-1,79)
8	Гипоксия+ DTE	5	6,72 (6,63-6,83) $p_{5-8}<0,05$; $p_{4-8}<0,05$	6,00 (5,97-6,32) $p_{5-8}<0,05$; $p_{4-8}<0,05$	0,72 (0,34-0,81)

Оценка изменения концентрации восстановленного глутатиона в опухолевых клетках линии P19 при нормоксии показала, что добавление к культуре NEM приводило к статистически значимому снижению показателя на 76,50 % ($p<0,05$), а воздействие DTE сопровождалось значимым увеличением

показателя на 60,25 % ($p<0,05$) относительно концентрации, полученной при нормоксии (Таблица 16).

Интересно, что в условиях нормального содержания кислорода внесение в культуральную среду предшественника синтеза глутатиона (NAC), не приводило к статистическому увеличению концентрации восстановленного глутатиона в опухолевых клетках линии P19 ($p>0,05$) по сравнению показателями, полученными в условиях нормоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Таблица 16). Можно предположить, что основной причиной этого является аллостерическая регуляция ферментов синтеза глутатиона конечным продуктом этого метаболического пути.

Добавление блокатора тиоловых групп пептидов и белков (NEM) в среду инкубирования приводило к статистически значимому снижению концентрации общего глутатиона в опухолевых клетках линии P19 при гипоксии на 59,05 % ($p<0,05$), а добавление предшественника синтеза глутатиона (NAC) или протектора тиоловых групп пептидов и белков (DTE) – к статистически значимому увеличению показателя на 20,78 % ($p<0,05$) и 38,27 % ($p<0,05$), соответственно, по сравнению с результатом, зафиксированным при гипоксии (Таблица 16).

Добавление DTE или NAC в среду инкубирования при моделировании гипоксии не приводило к статистически значимым изменениям содержания окисленного глутатиона в опухолевых клетках линии P19 ($p>0,05$) относительно значения, полученного в условиях гипоксии без воздействия указанных редокс-модуляторов (Таблица 16). Статистически значимое увеличение внутриклеточной концентрации GSSG на 60,47 % ($p<0,05$) в опухолевых клетках линии P19 в условиях сниженного напряжения кислорода было получено при добавлении в среду инкубации NEM относительно показателя, зафиксированного при гипоксии (Таблица 16). Следовательно, можно сделать заключение о значительном нарушении редокс-баланса в опухолевых клетках линии P19 и формировании выраженного ОС.

Дополнительное внесение NEM в среду инкубации опухолевых клеток линии P19 в условиях гипоксии вызывало статистически значимое снижение концентрации GSH на 70,91 % ($p<0,05$), а добавление DTE – статистически значимое увеличение показателя на 34,23 % ($p<0,05$) относительно значения, полученного при гипоксии (Таблица 16). Добавление в среду инкубации NAC в условиях сниженного напряжения кислорода не приводило к статистически значимому изменению содержания восстановленного глутатиона в опухолевых клетках линии P19 ($p>0,05$) относительно значения, полученного в условиях гипоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Таблица 16). Причиной снижения активности фермента синтеза глутатиона является аллостерическая регуляция скорости конечным продуктом метаболической цепи.

Моделирование гипоксии в опухолевых клетках линии P19 и добавление DTE вызывало статистически значимое снижение содержания общего и восстановленного глутатиона на 28,89 % ($p<0,05$) и 33,85 % ($p<0,05$) по сравнению с показателем, полученном при нормоксии и действии DTE, соответственно (Таблица 16).

Важным показателем, отражающим редокс-статус в клетке является величина соотношения содержания восстановленной и окисленной форм глутатиона (GSH/GSSG). При нормоксии в опухолевых клетках линии P19 в условиях дополнительного добавления в среду инкубации NEM было зафиксировано статистически значимое снижение величины отношения GSH/GSSG на 88,94 % ($p<0,05$) относительно показателя, полученного при нормальном напряжении кислорода (Таблица 17).

В условиях нормоксии добавление в среду для культивирования опухолевых клеток линии P19 NAC или DTE характеризовалось сопоставимыми значениями величины соотношения восстановленной и окисленной фракций глутатиона по сравнению с показателями, полученными при нормальном напряжении кислорода ($p>0,05$) (Таблица 17). По-видимому, изменения редокс-статуса, возникающие в опухолевых клетках линии P19 под воздействием данных

соединений могут определенным образом компенсироваться за счет работы внутриклеточных систем, вовлеченных в редокс-регуляцию.

Таблица 17 – Величина соотношения восстановленной формы глутатиона к окисленной и содержание SH-групп белков в опухолевых клетках линии P19, культивированных в условиях нормоксии, гипоксии и дополнительном добавлении NEM или NAC, или DTE, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Величина соотношения GSH/GSSG	Содержание SH-групп белков, нмоль/мг белка
1	Нормоксия	5	18,44 (13,15-20,29)	19,23 (18,94-21,57)
2	Нормоксия +NEM	5	2,04 (1,69-5,36) $p_{1-2}<0,05$	9,29 (8,30-9,41) $p_{1-2}<0,05$
3	Нормоксия +NAC	5	14,49 (9,68-17,29)	13,16 (12,38-14,70) $p_{1-3}<0,05$
4	Нормоксия +DTE	5	23,71 (12,91-24,68)	11,45 (10,27-12,16) $p_{1-4}<0,05$
5	Гипоксия	5	10,19 (9,88-11,35) $p_{1-5}<0,05$	8,76 (7,83-10,55) $p_{1-5}<0,05$
6	Гипоксия+ NEM	5	1,89 (0,93-4,22) $p_{5-6}<0,05$	9,62 (9,40-10,28)
7	Гипоксия+ NAC	5	12,47 (2,10-14,73)	11,60 (11,58-12,62) $p_{5-7}<0,05$
8	Гипоксия+ DTE	5	8,37 (7,93-17,27)	12,98 (12,75-13,36) $p_{5-8}<0,05$

В опухолевых клетках линии P19 в условиях гипоксии под воздействием NEM зафиксировано статистически значимое снижение величины соотношения GSH/GSSG на 81,45 % ($p<0,05$) относительно показателя, полученого при гипоксии (Таблица 17). Вероятно, что выраженные отклонения значений данной величины соотношения, связанные, с одной стороны, со снижением содержания

GSH, а с другой, с повышением концентрации GSSG в опухолевых клетках линии P19, могут быть сопряжены с гибелью клеток по типу некроза.

Добавление в среду инкубации опухолевых клеток линии P19 NAC или DTE при гипоксии не изменяло величину соотношения восстановленной и окисленной фракций глутатиона ($p>0,05$) по сравнению со значением, полученным в условиях гипоксии без воздействия указанных редокс-модуляторов (Таблица 17). По-видимому, изменения редокс-статуса, возникающие в опухолевых клетках линии P19 под воздействием данных соединений носят кратковременный характер и могут определенным образом компенсироваться за счет работы внутриклеточных систем, вовлеченных в редокс-регуляцию.

Важную роль в поддержании внутриклеточного редокс-баланса играют свободные тиоловые группы молекул белков и пептидов. В условиях нормоксии в опухолевых клетках линии P19 при добавлении в среду культивирования NEM отмечалось статистически значимое снижение концентрации свободных SH-групп белков на 51,69 % ($p<0,05$), DTE – 40,46 % ($p<0,05$), а NAC – 31,57 % ($p<0,05$) по сравнению с показателем, полученном при нормоксии (Таблица 17).

Интересно, что при культивировании клеток опухолевой линии P19 в условиях гипоксии с внесением NEM были получены сопоставимые значения концентрации тиоловых групп белков ($p>0,05$) относительно показателя, полученного в условиях гипоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Таблица 17). Однако, воздействие как NAC, так и DTE при гипоксии приводило к статистически значимому увеличению концентрации восстановленных SH-групп белков в опухолевых клетках линии P19 на 32,42 % ($p<0,05$) и 48,17 % ($p<0,05$), соответственно, по сравнению с результатом, полученном при гипоксии (Таблица 17).

При определении активности глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в опухолевых клетках линии P19 в условиях нормоксии и модуляции редокс-статуса нами было установлено, что добавление NEM в среду инкубации вызывало статистически значимое уменьшение активности глутатионредуктазы

на 54,06 % ($p<0,05$) на фоне увеличения активности глутатионпероксидазы на 78,36 % ($p<0,05$) по сравнению со значениями, полученными при нормальном напряжении кислорода (Таблица 18).

Таблица 18 – Активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в опухолевых клетках линии P19, культивированных в условиях нормоксии, гипоксии и дополнительном добавлении NEM или NAC, или DTE, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Активность глутатионредуктазы, мкмоль/мин•мг белка	Активность глутатионпероксидазы, мкмоль/мин•мг белка
1	Нормоксия	5	3,57 (3,33-3,90)	1,34 (1,25-1,40)
2	Нормоксия +NEM	5	1,64 (1,60-1,79) $p_{1-2}<0,05$	2,39 (2,38-2,44) $p_{1-2}<0,05$
3	Нормоксия +NAC	5	4,20 (3,79-4,78)	1,34 (1,31-1,35)
4	Нормоксия +DTE	5	3,39 (2,98-3,57)	2,01 (1,85-2,03) $p_{1-4}<0,05$
5	Гипоксия	5	6,08 (5,62-10,20) $p_{1-5}<0,05$	1,01 (0,95-1,03) $p_{1-5}<0,05$
6	Гипоксия+ NEM	5	1,86 (1,75-2,08) $p_{5-6}<0,05$	0,92 (0,91-0,93) $p_{2-6}<0,05$
7	Гипоксия+ NAC	5	3,59 (3,46-5,00) $p_{5-7}<0,05$	0,86 (0,81-0,91) $p_{5-7}<0,05$; $p_{3-7}<0,05$
8	Гипоксия+ DTE	5	5,38 (4,91-5,55) $p_{5-8}<0,05$; $p_{4-8}<0,05$	1,82 (1,82-2,00) $p_{5-8}<0,05$

Воздействие DTE в условиях нормоксии в опухолевых клетках линии P19 сопровождалось статистически значимым увеличением активности глутатионпероксидазы на 50,00 % ($p<0,05$) на фоне сопоставимой активности глутатионредуктазы относительно показателей, полученных при нормоксии

(Таблица 18). По-видимому, такое изменение может быть объяснено регуляцией активности глутатионпероксидазы за счет изменения доступности субстрата (GSH) под воздействием DTE.

N-ацетилцистеин в условиях нормоксии в опухолевых клетках линии P19 не вызывал статистически значимых изменений активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы по сравнению с показателями, полученными в условиях нормоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Таблица 18).

Изменение состояния системы глутатиона в опухолевых клетках линии P19 при гипоксии было сопряжено с изменением активности глутатион-зависимых ферментов. Дополнительное внесение NEM в среду инкубации опухолевых клеток линии P19 в условиях гипоксии приводило к статистически значимому снижению активности глутатионредуктазы на 69,41 % ($p<0,05$) на фоне сопоставимого значения активности глутатионпероксидазы относительно результатов, полученных при гипоксии (Таблица 18).

Дополнительное внесение NAC в среду инкубации опухолевых клеток линии P19 в условиях гипоксии сопровождалось статистически значимым снижением активности как глутатионредуктазы на 40,95 % ($p<0,05$), так и активности глутатионпероксидазы на 14,85 % ($p<0,05$) относительно значений, полученных при гипоксии (Таблица 18). Воздействие DTE на активность изучаемых ферментов в опухолевых клетках линии P19 при моделировании гипоксии было разнонаправленным. Так, активность глутатионредуктазы была статистически значимо ниже на 11,51 % ($p<0,05$), а активность глутатионпероксидазы выше на 80,20 % ($p<0,05$) по сравнению с результатами, зафиксированными при гипоксии (Таблица 18).

В опухолевых клетках линии P19 в условиях гипоксии и дополнительном добавлении DTE нами было зафиксировано статистически значимое увеличение активности глутатионредуктазы на 58,70 % ($p<0,05$), а при внесении NEM значимое снижение активности глутатионпероксидазы на 61,51 % ($p<0,05$), NAC –

на 35,82 % ($p<0,05$) относительно значения, полученного при нормоксии и действии соответствующего редокс-модулятора, соответственно (Таблица 18).

Глутатионилирование и карбонилирование белков имеют важное значение в изменении функциональных свойств ключевых протеинов опухолевых клеток. Белково-связанный глутатион – показатель, который отражает содержание белков, подвергнутых этой окислительной модификации. При изучении обратимой и необратимой окислительной модификации белков в опухолевых клетках линии P19 нами было установлено, что в условиях нормоксии и дополнительном внесении в среду инкубирования NEM происходило статистически значимое увеличение содержания белково-связанного глутатиона на 308,33 % ($p<0,05$) и карбонильных производных белков на 132,48 % ($p<0,05$) по сравнению с результатами, полученными при нормоксии (Таблица 19). Однако, добавление DTE или NAC в среду инкубирования опухолевых клеток линии P19 не сопровождалось статистически значимым изменением изучаемых параметров относительно значений, полученных в условиях нормоксии без воздействия указанных редокс-модуляторов (Таблица 19).

Добавление NAC или DTE в среду инкубирования клеток опухолевой линии P19 при гипоксии приводило к статистически значимому снижению концентрации белково-связанного глутатиона на 15,38 % ($p<0,05$) и 28,85 % ($p<0,05$), соответственно, по сравнению с результатом, зафиксированными при гипоксии (Таблица 19). Воздействие NEM не вызывало статистически значимого изменения изучаемого параметра в опухолевых клетках линии P19 в условиях моделирования гипоксии относительно показателя, полученного при гипоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Таблица 19).

При гипоксии и воздействии блокатора тиоловых групп пептидов и белков (NEM) на опухолевые клетки линии P19 содержание карбонильных производных белков, отражающее уровень необратимой окислительной модификации белковых молекул, статистически значимо повышалось на 41,00 % ($p<0,05$) относительно значения, установленного при гипоксии (Таблица 19).

Таблица 19 – Содержание белково-связанного глутатиона и карбонильных производных белков в опухолевых клетках линии P19, культивированных в условиях нормоксии, гипоксии и дополнительном добавлении NEM или NAC, или DTE, Me (Q_1-Q_3)

№	Группа	n	Содержание карбонильных производных белков, нмоль/мг белка	Содержание белково-связанного глутатиона, нмоль/мг белка
1	Нормоксия	5	4,68 (4,63-4,73)	0,60 (0,58-0,74)
2	Нормоксия +NEM	5	10,88 (10,68-12,49) $p_{1-2}<0,05$	2,45 (2,36-2,87) $p_{1-2}<0,05$
3	Нормоксия +NAC	5	5,50 (5,14-6,50)	0,76 (0,72-0,78)
4	Нормоксия +DTE	5	4,59 (4,44-4,65)	0,78 (0,67-0,83)
5	Гипоксия	5	10,17 (8,92-10,39) $p_{1-5}<0,05$	2,08 (1,95-2,19) $p_{1-5}<0,05$
6	Гипоксия+ NEM	5	14,34 (14,27-17,63) $p_{5-6}<0,05$; $p_{2-6}<0,05$	2,96 (2,08-3,26)
7	Гипоксия+ NAC	5	3,08 (2,93-4,21) $p_{5-7}<0,05$	1,76 (1,59-1,91) $p_{5-7}<0,05$; $p_{3-7}<0,05$
8	Гипоксия+ DTE	5	7,54 (6,64-8,32) $p_{4-8}<0,05$	1,48 (1,43-1,51) $p_{5-8}<0,05$; $p_{4-8}<0,05$

Дополнительное добавление NAC в инкубационную среду опухолевых клеток линии P19 при гипоксии приводило к статистически значимому снижению концентрации карбонильных производных белков на 69,71 % ($p<0,05$) по сравнению с результатом, полученном при гипоксии (Таблица 19). Воздействие DTE, обладающего способностью восстанавливать сульфгидрильные группы (в том числе входящие в состав смешанных дисульфидов белок-S-S-глутатион), не

приводило к статистически значимому изменению изучаемого параметра относительно показателя, полученного в условиях гипоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Таблица 19). На первый взгляд такой эффект кажется противоречивым, но принимая во внимание способность восстановленных (под воздействием DTE) SH-групп белков необратимо окисляться это вполне объяснимо [141].

Моделирование гипоксии в опухолевых клетках линии P19 и добавление NEM вызывало статистически значимое увеличение концентрации карбонильных производных белков на 31,80 % ($p<0,05$), DTE – 64,27 % ($p<0,05$), а также содержания белково-связанного глутатиона при внесении NAC на 131,58 % ($p<0,05$), DTE – 89,74 % ($p<0,05$) относительно значений, полученных при нормоксии и действии соответствующего редокс-модулятора, соответственно (Таблица 19).

Таким образом, в условиях нормального напряжения кислорода воздействие блокатора SH-групп пептидов и белков (NEM) сопровождалось максимальным эффектом активации программированной гибели опухолевых клеток линии P19, как по рецепторному, так и по митохондриальному пути. Помимо этого при дополнительном добавлении NEM в среду инкубации в опухолевых клетках линии P19 формировался наиболее выраженный ОС, сопровождающийся изменением состояния системы глутатиона и накоплением окислительно модифицированных белков. Однако, в условиях нормоксии воздействие протектора SH-групп пептидов и белков (DTE) и предшественника синтеза глутатиона (NAC) на опухолевые клетки линии P19 не давало таких эффектов.

В условиях сниженного напряжения кислорода воздействие блокатора SH-групп пептидов и белков (NEM) на опухолевые клетки линии P19 сопровождалось дисбалансом в системе глутатиона, накоплением карбонильных производных белков на фоне активации программированной гибели, как по рецепторному, так и по митохондриальному пути. Воздействие DTE или NAC при гипоксии на

опухолевые клетки линии P19 приводило к снижению окислительной модификации белков, что не отражалось на реализации апоптотической программы гибели в этих клетках.

Глава 4. Обсуждение результатов

4.1 Регуляция и реализация апоптоза, изменение состояния системы глутатиона и окислительной модификации белков в опухолевых клетках линии P19 в условиях нормоксии и гипоксии

В настоящее время актуальной проблемой медико-биологической науки является идентификация молекулярных механизмов таргетного управления программированной гибелью клеток. Нарушение регуляции апоптоза показано при многих патологических процессах в клетках, в том числе при опухолевом росте [33, 73, 120, 164]. Известно, что опухолевый рост, сопровождается гипоксией, наработкой АФК, нарушением редокс-баланса клетки с последующим развитием ОС [16, 153, 155, 163, 167]. Одним из отличий опухолевых клеток от нормальных является более высокий базовый уровень ОС [19, 95, 138, 159, 254]. С другой стороны, высокая концентрация АФК может быть токсична для опухолевых клеток. В настоящий момент накоплено немало доказательств того, что АФК (в частности, $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2) являются вторичными мессенджерами внутриклеточных сигнальных каскадов, индуцирующих и поддерживающих злокачественный фенотип опухолевых клеток [67, 70, 95, 96, 159]. Для контроля содержания АФК в клетке предусмотрена система антиоксидантной защиты, направленная на поддержание редокс-гомеостаза [21]. При его нарушении активируются процессы окисления основных биомакромолекул в клетке (липидов, белков, нуклеиновых кислот) [3, 221, 235]. Одним из основных компонентов поддержания редокс-статуса клеток является система глутатиона. Глутатион выступает основным акцептором АФК, а также коферментом ряда ферментов антиоксидантной и детоксикационной систем [17, 277]. Соотношение концентраций GSH и GSSG в клетке определяет её редокс-статус. Необходимо отметить, что SH-содержащие молекулы рассматриваются в качестве сенсоров редокс-сигнальных путей передачи внутриклеточного сигнала [39, 41, 151].

Высокая скорость взаимодействия сенсорных молекул с АФК обеспечивается наличием в структуре молекул групп, которые способны прямо реагировать с окисляющим агентом. В белках эту роль в редокс-сигнализации выполняют цистеиновые остатки (Cys-SH). При взаимодействии с АФК последние могут подвергаться окислению в цистеинсульфеновую (Cys-SOH), цистеинсульфиновую (Cys-SO_2H) и цистеинсульфоновую (Cys-SO_3H) кислоты, тем самым выполняя важную роль в клеточной сигнализации путем изменения конформации и активности белков [5, 129, 141]. Кроме этого, редокс-статус тиоловых групп цистеина в составе молекул белков играет важную роль в их фолдинге и рефолдинге, а также в процессе обратимой окислительной модификации – глутатионилировании.

Современная концепция устойчивости опухолевых клеток к программированной гибели базируется на их способности успешно существовать в условиях ОС и низкого напряжения кислорода в клетке. Использованная модель гипоксии в нашей работе позволяла создать условия повышенной продукции АФК в опухолевых клетках линии Р19.

В проведенном нами исследовании было установлено статистически значимое возрастание числа аннексин-положительных клеток на фоне увеличения содержания АФК (H_2O_2) и гидроксильного радикала в опухолевых клетках линии Р19, инкубированных в условиях гипоксии, по сравнению с результатами, полученными при нормоксии (Таблица 3, 6, 12, 15). Также в условиях гипоксии был зафиксирован расход компонентов системы глутатиона (статистически значимое уменьшение концентрации общего глутатиона за счет восстановленной формы тиола) и свободных SH-групп белков, что приводило к снижению редокс-статуса опухолевых клеток линии Р19 (Таблица 7, 8, 16, 17). Для оценки вклада гипоксии в регуляцию рецепторного пути апоптоза опухолевых клеток линии Р19 нами проводилось определение количества TNF RI- и Fas-положительных клеток. В результате проведенного исследования было установлено отсутствие статистически значимых изменений в количестве клеток, несущих на своей

мембране рецепторы клеточной гибели, при моделировании гипоксии по сравнению с нормоксией (Таблица 5, 14).

Одним из ранних маркеров запуска апоптоза по митохондриальному пути опухолевых клеток линии P19, инкубированных в условиях гипоксии, является статистически значимое увеличение числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом и содержания внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} относительно результатов, полученных при нормоксии (Таблица 4, 13).

Таким образом, наши исследования, подтверждаемые данными других авторов, свидетельствуют о ведущем значении митохондриального пути запуска апоптоза при гипоксии. Так, M. Weinmann с соавторами (2004), используя клетки опухолевой линии Jurkat с определенными дефектами внешнего либо внутреннего сигнальных путей запуска апоптоза, изучали вклад обоих механизмов в реализацию программы клеточной гибели в условиях гипоксии [165]. В частности, в их работе было показано, что на запуск апоптоза при гипоксии не влияет активность каспазы 8 или FADD (Fas-associated DD-protein – адаптер Fas-ассоциированного домена смерти), в то же время сверхэкспрессия Bcl-2 или экспрессия прокаспазы 9 делали клетки устойчивыми к апоптозу, вызванному гипоксией. По мнению авторов, данные результаты свидетельствовали о ведущей роли митохондриального пути запуска апоптоза при гипоксии [165].

Основным способом поддержания уровня ионов Ca^{2+} в цитоплазме является транспорт последнего из клетки против градиента концентрации. Важная роль в данном процессе принадлежит Ca^{2+}-АТФазе, расположенной на плазмолемме (PMCA). На активность PMCA, кроме Ca^{2+}/кальмодулина, оказывают влияние некоторые протеазы, в частности кальпаины.

Несмотря на существование большого разнообразия механизмов, принимающих участие во внутриклеточной регуляции и поддержании гомеостаза ионов Ca^{2+}, вклад PMCA большинством исследователей признается решающим, по крайней мере, в поддержании постоянно низких значений показателя

концентрации ионов Ca^{2+} в долгосрочной перспективе. F. Benetti и соавторами было продемонстрировано, что даже при ингибировании всех других механизмов, вовлеченных в поддержание низкой концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме, активности PMCA было в большинстве случаев достаточно для плавного преодоления скачков уровня данного иона в клетках [124].

В настоящее время существуют доказательства, указывающие на то, что АФК принимают участие в регуляции работы PMCA (как напрямую, так и через взаимодействие с кальмодулином) [47]. Функция белков-переносчиков ионов Ca^{2+} контролируется внутриклеточным редокс-статусом. Установлено, что RyR и IP3R являются редокс-чувствительными рецепторами, причем их окислительная модификация способствует открытию каналов и выходу ионов Ca^{2+} в цитоплазму. В основе модуляции рианодиновых рецепторов лежит окисление тиоловых групп, глутатионилирование и нитрозилирование. Наряду с этим установлено что, работа SERCA инактивируется путем нитрозилирования остатков цистеина и окисления сульфгидрильных групп в составе сайта связывания АТФ, что способствует запуску апоптоза. С другой стороны, глутатионилирование активирует SERCA [83].

Таким образом, окислительная модификация ион-транспортирующих комплексов приводит к изменению активности ферментов и содержанию вторичных мессенджеров в клетке и, в первую очередь, ионов Ca^{2+}. Установлена прямая зависимость между нарушением гомеостаза ионов кальция, деполяризацией внутренней митохондриальной мембраны и запуском апоптоза клеток [82]. Приведенные данные показывают, что накопление АФК может приводить к повышению концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме клеток за счет ухудшения работы систем, обеспечивающих в норме низкий уровень данного иона. Таким образом, повышение содержания ионов Ca^{2+} можно рассматривать как характерный признак патологических процессов, ассоциированных с формированием ОС.

Важно отметить, что при инкубировании опухолевых клеток линии Р19 в условиях гипоксии происходила активация окислительной модификации белков, что выражалось в статистически значимом увеличении содержания белково-связанного глутатиона и карбонильных производных белков по сравнению с результатами, полученными при нормоксии (Таблица 10, 19).

В проведенном исследовании на клетках опухолевой линии Р19 в условиях гипоксии нами установлена взаимосвязь между повышением окислительно-модифицированных белков и вступлением клеток в апоптоз. Так, была получена статистически значимая сильная положительная корреляция между количеством аннексин-позитивных клеток и концентрацией белково-связанного глутатиона ($r=+0,853$; $p<0,05$). Кроме того, прослеживалась статистически значимая сильная отрицательная корреляция между количеством Fas- и TNF RI-положительных клеток и внутриклеточной концентрацией ионов Ca^{2+} ($r=-0,862$; $p<0,05$) и ($r=-0,922$; $p<0,05$), соответственно. Статистически значимая сильная отрицательная корреляция установлена между содержанием GSSG и количеством аннексин-позитивных клеток ($r=-0,903$; $p<0,05$), а также между содержанием GSSG и белково-связанным глутатионом ($r=-0,867$; $p<0,05$).

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод об активации апоптотической гибели опухолевых клеток линии Р19 в условиях гипоксии преимущественно по митохондриальному пути, сопряженному с накоплением окислительно-модифицированных белков.

Ключевая роль в активации апоптоза при гипоксии принадлежит транскрипционному фактору p53, при этом молекулярные механизмы программированной гибели клеток включают выход цитохрома с, активацию Apaf-1 и каскада каспаз. К белкам-регуляторам апоптоза, обладающим высокой чувствительностью к изменению внутриклеточного редокс-статуса, относят белки семейства Bcl-2. Так, проапоптотический белок Bax, активируется за счет образования дисульфидных связей при гомодимеризации молекулы [180].

Исследования метаболизма опухолевых клеток, проведенные Отто Варбургом более 85 лет назад, показали, что малигнизированные клетки характеризуются двух-трех кратным повышением скорости гликолиза по сравнению с нормальными клетками и снижением окислительного фосфорилирования. Таким образом, опухолевая трансформация сопровождается дисфункцией митохондрий, поскольку опухолевые клетки демонстрируют увеличение величины соотношения гликолиз/дыхание (эффект Варбурга) [9, 12, 56, 149, 273]. Кроме этого было показано, что эмбриональная изоформа пируваткиназы присутствует исключительно в опухолевых клетках и это одна из основных причин сдвига клеточного метаболизма в сторону гликолиза (даже в аэробных условиях), способствующего опухолевой прогрессии. В результате гликолиз становится основным метаболическим путем необходимым для энергетического обеспечения жизнедеятельности опухолевой клетки. В настоящее время активно обсуждается зависимость гибели опухолевых клеток от изменения pH и концентрации глюкозы [7, 56, 162]. Однако, исследование Y. Pan и соавторов указывает, что активация апоптоза при гипоксии не зависит от сопутствующего ацидоза и снижения концентрации глюкозы [189].

Основным регулятором внутриклеточного редокс-статуса является глутатион. Благодаря строению пептидной связи L-γ-глутамил-L-цистеинилглицин устойчив к действию большинства пептидаз. Основная часть глутатиона в клетке находится в восстановленной форме. Важно отметить, что GSH может напрямую обезвреживать супероксидный анион-радикал и гидроксильный радикал, а также уменьшать концентрацию пероксида водорода, однако последняя реакция зависит от активности глутатионпероксидазы [21]. Кроме того, глутатион поддерживает сульфгидрильные группы белков в восстановленном состоянии. Окисленная форма глутатиона состоит из двух молекул трипептида, соединенных дисульфидной связью. Величину соотношения GSH/GSSG в клетках эффективно поддерживает фермент глутатионредуктаза. Активность фермента зависит от концентрации НАДФН•H^+. Величина

соотношения восстановленной формы глутатиона к окисленной определяет редокс-статус клетки, который регулирует редокс-чувствительных сигнальных каскадов [10, 42, 100, 128, 129].

Формирование ОС в значительной степени зависит от внутриклеточной активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Результаты наших исследований подтверждают предположение, что данные ферменты играют важную роль в редокс-регуляции клеточных сигнальных каскадов в условиях гипоксии в опухолевых клетках линии P19. Изучение активности глутатионзависимых ферментов при гипоксии в опухолевых клетках линии P19 выявило разную направленность в их работе. Так, при гипоксии активность глутатионредуктазы статистически значимо повышалась, а активность глутатионпероксидазы статистически значимо понижалась относительно результатов, полученных при нормоксии в опухолевых клетках линии P19 (Таблица 9, 18). Вероятнее всего установленная особенность работы глутатиопероксидазы обусловлена чувствительностью к продуктам ОС в условиях гипоксии, которые могли вызывать окислительную модификацию структуры белка. В свою очередь, повышение активности глутатионредуктазы могло быть вызвано увеличением содержания GSSG – субстрата реакции, но стоит отметить, что мощность фермента была не достаточной для поддержания концентрации GSH в условиях гипоксии относительно результатов, полученных в опухолевых клетках линии P19 при нормоксии (Таблица 7, 16). Установленная нами статистически значимая сильная положительная корреляция между активностью глутатионредуктазы и содержанием белково-связанного глутатиона ($r=+0,891$; $p<0,05$) доказывает непосредственное участие системы глутатиона в регуляции содержания окислительно-модифицированных белков в опухолевых клетках линии P19 в условиях гипоксии.

На клеточных линиях U937 и HepG2 была продемонстрирована важная взаимосвязь между GSH и антиапоптотическим фактором Bcl-2 – снижение содержания GSH в клетках со сверхэкспрессией *BCL-2* возвращало им

чувствительность к апоптозу. Помимо этого высокая концентрация Bcl-2 вызывает перемещение глутатиона в ядро, что, предположительно, связано еще и с ингибированием активности каспаз. Также доказано, что каспаза 3 способна гидролитически разрушать каталитическую субъединицу γ-глутамилцистеинсинтетазы, следовательно способствовать снижению синтеза GSH. Таким образом, инактивация ключевого фермента синтеза глутатиона и выход трипепида из клеток могут являться важной последовательностью событий при запуске апоптоза [17].

На начальном этапе апоптоза нарушение редокс-гомеостаза клеток сопряжено со снижением концентрации GSH, что приводит к формированию ОС. В результате окисления или глутатионилирования цистеиновых остатков изменяется активность протеаз, участвующих в апоптозе. Так было показано, что уменьшение потерь GSH сопровождается снижением доли клеток, вступивших в апоптоз [220].

Реакции с участием сульфгидрильных групп белков играют важную роль в жизнедеятельности клеток в норме и в условиях ОС, вовлекаясь в процессы антиоксидантной защиты против окислителей, свободных радикалов и электрофилов. При ОС модуляция тиол-дисульфидного статуса остатков цистеина в составе ферментов, рецепторов, транспортных белков и факторов транскрипции является важным механизмом сигнальной трансдукции, ассоциированной с опухолевой прогрессией. Основным типом модификации SH-групп остатков цистеина является обратимое формирование смешанных дисульфидов белков с глутатионом – небелковым тиолом в клетках. Глутатионилирование белков повышается при выраженном ОС, так как при увеличении концентрации АФК восстановленная форма глутатиона превращается в окисленную – более реакционно-способную к образованию дисульфидного взаимодействия с белками. Необходимо отметить, что процесс обратимой окислительной модификации – глутатионилирования, для белка может означать как увеличение функциональной способности, так и ее снижение. Во многих работах была показана ингибиторная

роль глутатионилирования для таких белков, как глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, фосфофруктокиназа, ядерный фактор 1, NF-κB, IκB киназа, протеинтирозинфосфатаза 1B, карбоангидраза III, актин, протеинкиназа Cα, креатинкиназа, тирозингидроксилаза, протеинфосфатаза 2A, протеинкиназа A, митохондриальный комплекс I дыхательной цепи [72, 122, 170]. В то же время, существует множество доказательств того, что глутатионилирование означает активацию белков, например, для фермента глутатион-S-трансферазы, фосфатазы карбоангидразы III, протеазы HIV-1 (human immunodeficiency virus 1 – вирус иммунодефицита человека 1), металлопротеиназы, hRas (GTP-ase HRas), SERCA и митохондриального комплекса II. Несмотря на то, что данный список далеко не полный, он отражает широту разнообразия белков, активность которых может быть модулирована (как в сторону повышения, так и в сторону понижения) через глутатионилирование [127, 147, 207]. При этом глутатионилирование может затрагивать активные центры ферментов или участки белок-белковых взаимодействий. Например, в настоящее время показано, что протеинтирозинфосфатаза 1B (регулирует фосфорилирование по остаткам тирозина и участвует в опухолевой прогрессии) подвергается обратимому окислению тиоловых групп и инактивации фермента (исследование проведено на двух типах опухолевых клеток: HepG2 и A431) [170].

В результате чрезмерной продукции АФК неизбежно происходит необратимая окислительная модификация белков, принимающих участие как в реализации, так и в регуляции апоптотической гибели опухолевых клеток. Карбонилирование белковых молекул при ОС в основном происходит при участии перекисда водорода. Формирование карбонильных производных таких аминокислотных остатков, как лизин и аргинин, в частности, может приводить к тому, что заряженные аминокислоты превращаются в нейтральные. Установлено, что карбонилированные молекулы белков могут быть причиной вторичного повреждения других макромолекул клетки [4, 37, 192]. В проведенном исследовании показано, что опухолевые клетки линии P19, инкубированные в

условиях гипоксии, характеризовались активацией апоптоза на фоне увеличения содержания карбонильных производных белков.

Апоптоз в опухолевых клетках линии Р19 в условиях гипоксии реализовывался по митохондриальному пути, что свидетельствует о существенном вкладе, при сниженном напряжении кислорода, функционирования митохондрий и ион-транспортирующих систем, отвечающих за внутриклеточный уровень ионов Ca^{2+}. В свою очередь дисфункция митохондрий способствовала усилению ОС в изучаемых клетках в условиях гипоксии и активации окислительной модификации белков, в том числе протеинов, принимающих участие в реализации и регуляции апоптотической формы гибели.

4.2 Роль редокс-модуляторов в регуляции и реализации апоптоза опухолевых клеток линии Р19 при нормоксии и гипоксии

С целью выяснения молекулярных механизмов участия компонентов системы глутатиона и окислительной модификации белков в нарушении регуляции апоптоза, на следующем этапе диссертационного исследования нами было выполнено редокс-моделирование статуса опухолевых клеток линии Р19 с помощью внесения в среду инкубации блокатора SH-групп пептидов и белков – NEM в конечной концентрации 5 мМ, протектора SH-групп пептидов и белков – DTE в конечной концентрации 5 мМ и предшественника синтеза глутатиона – NAC в конечной концентрации 5 мМ. Редокс-модуляцию осуществляли как при нормальном напряжении кислорода, так и в условиях гипоксии. Для исследования предполагаемой роли прооксидантов и антиоксидантов в регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов широко применяется ингибиторный анализ. Такой экспериментальный подход позволяет определить редокс-зависимые молекулярные мишени реализации и регуляции апоптотической гибели опухолевых клеток линии Р19 в различных условиях напряжения

кислорода для разработки подходов таргетной терапии онкологических заболеваний.

Клеточный ответ в условиях нормоксии и гипоксии оценивали по изменению состояния системы глутатиона. Так, под воздействием NEM концентрация GSH снижалась и при нормоксии и при гипоксии, а под воздействием DTE, наоборот, увеличивалась. В силу иного механизма действия (в клетке выступает предшественником цистеина), NAC в меньшей степени влиял на концентрацию восстановленной формы трипептида (Рисунок 2, 3, 4; Таблица 16).

Рисунок 2 – Влияние N-этилмалеимида (блокатора SH-групп пептидов и белков) на рецепторный и митохондриальный пути программированной клеточной гибели, компоненты системы глутатиона, SH-группы белков, окислительную модификацию белков опухолевых клеток линии Р19 в условиях нормоксии и гипоксии (по результатам собственных исследований).

Примечание – Здесь и на рисунках 3 и 4: – красным цветом отмечены эффекты при нормоксии, синим – при гипоксии; снижение показателя «⟝», увеличение показателя «⟵»

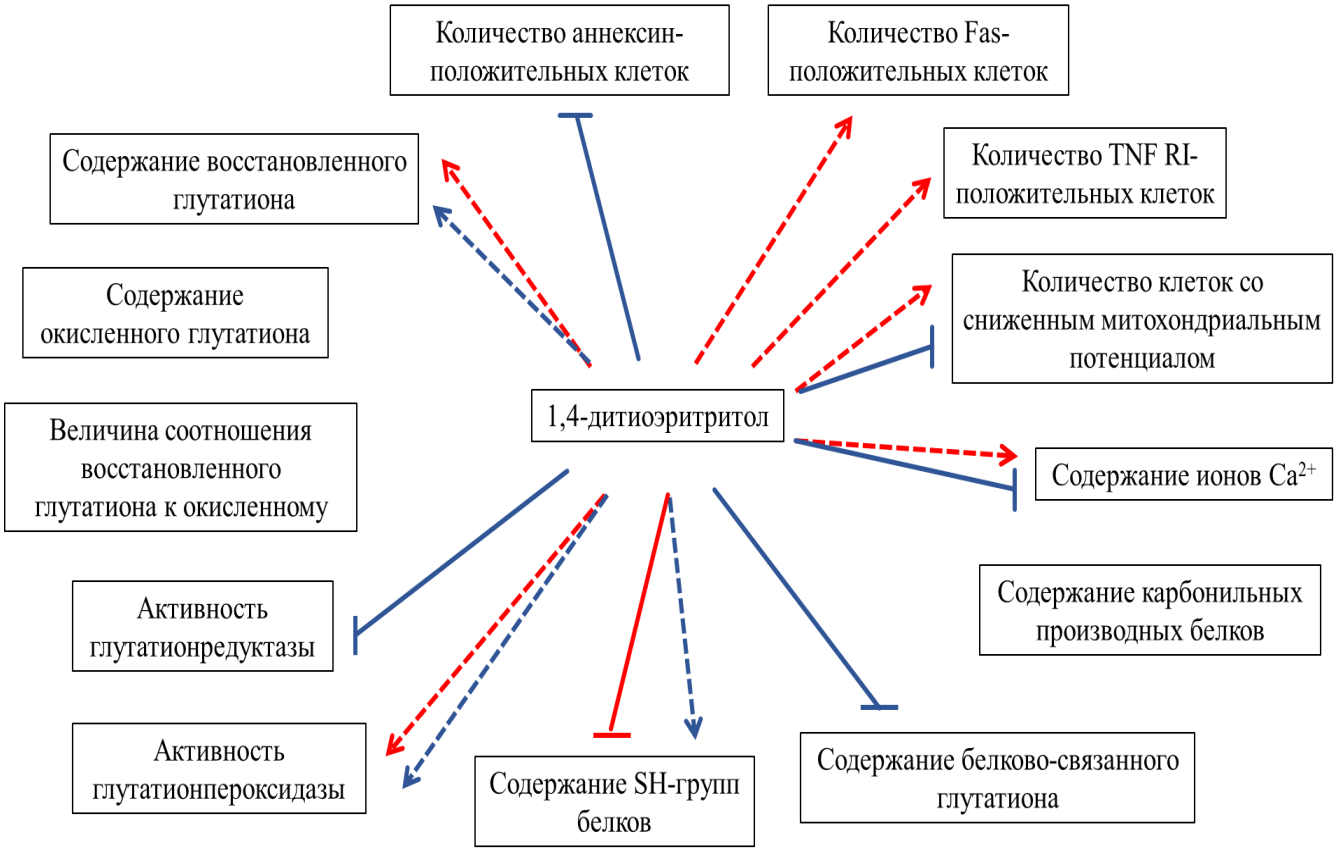

Рисунок 3 – Влияние 1,4-дитиоэритритола (протектора SH-групп пептидов и белков) на рецепторный и митохондриальный пути программированной клеточной гибели, компоненты системы глутатиона, SH-группы белков, окислительную модификацию белков опухолевых клеток линии Р19 в условиях нормоксии и гипоксии (по результатам собственных исследований)

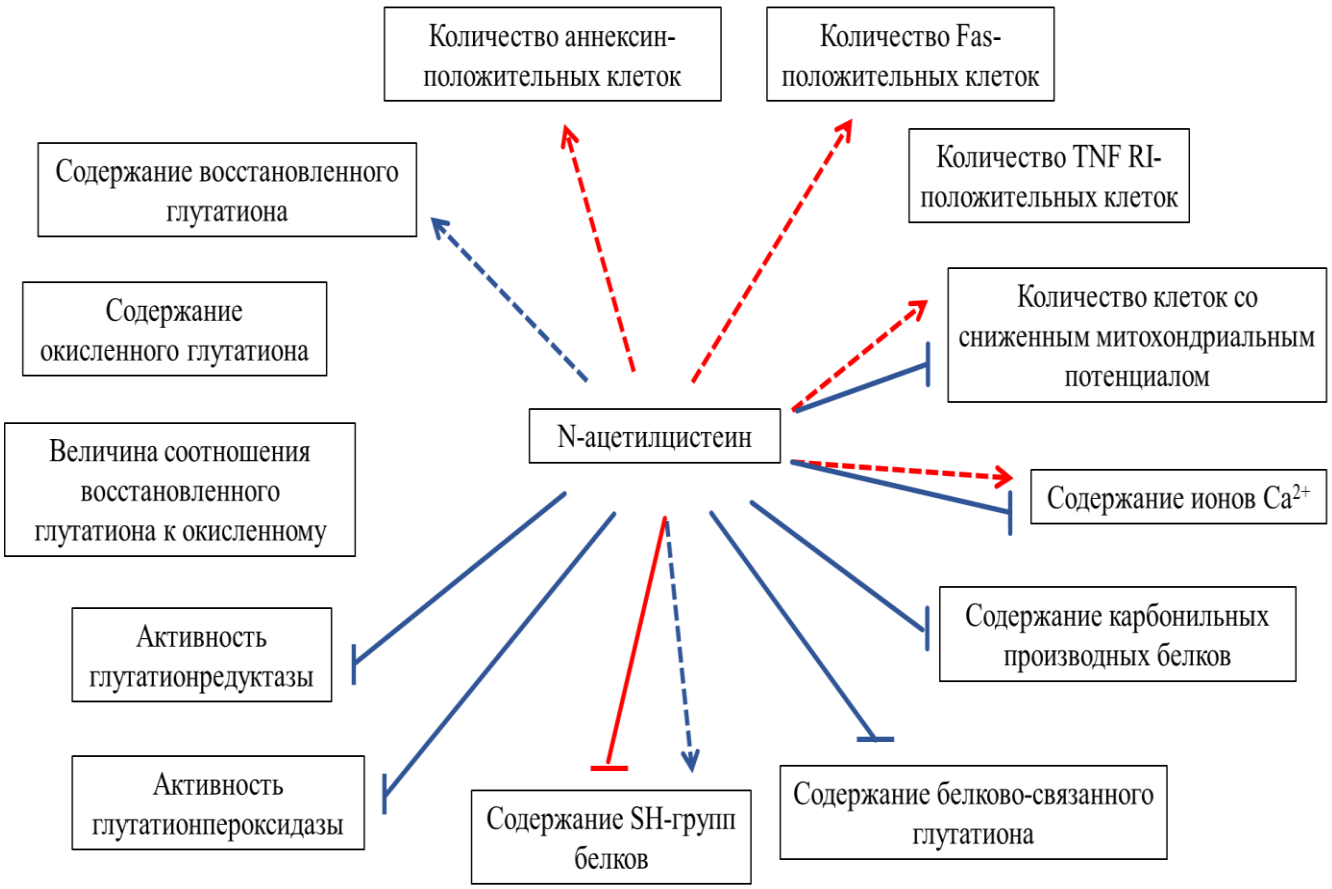

Рисунок 4 – Влияние N-ацетилцистеина (предшественника синтеза глутатиона) на рецепторный и митохондриальный пути программированной клеточной гибели, компоненты системы глутатиона, SH-группы белков, окислительную модификацию белков опухолевых клеток линии P19 в условиях нормоксии и гипоксии (по результатам собственных исследований)

Воздействие NEM в условиях нормоксии на опухолевые клетки линии P19 сопровождалось статистически значимым уменьшением продукции АФК (H_2O_2) и увеличением содержания гидроксильного радикала на фоне снижения величины соотношения восстановленного глутатиона к окисленному относительно данных, полученных при нормоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Таблица 15, 16, 17). Вероятнее всего, такое соотношение АФК обосновано преимущественным связыванием пероксида водорода со свободными SH-группами белков, концентрация которых при воздействии NEM статистически значимо снижались относительно показателя при нормоксии без воздействия

указанного редокс-модулятора (Таблица 17). Также было зафиксировано статистически значимое снижение содержания общего глутатиона, преимущественно за счет фракции восстановленной формы пептида, что повлекло за собой значимое снижение величины соотношения восстановленного глутатиона к окисленному (Таблица 16, 17). На наш взгляд, снижение концентрации GSH, было связано с усиленным использованием в глутатионпероксидазной реакции и с низкой скоростью его регенерации в глутатионредуктазной реакции. Статистически значимое увеличение активности глутатионпероксидазы в опухолевых клетках линии P19 при дополнительном добавлении в среду инкубации NEM в условиях нормального напряжения кислорода обеспечивало прирост окисленной формы глутатиона, что способствовало обратимой окислительной модификации белков – глутатионилированию, о чем свидетельствовало увеличение содержания белково-связанного глутатиона относительно значений при нормоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Таблица 16, 18, 19). Помимо этого, нами было установлено статистически значимое увеличение карбонильных производных белков в опухолевых клетках линии P19 при воздействии NEM в условиях нормоксии относительно показателя, зафиксированного при нормальном напряжении кислорода без воздействия указанного редокс-модулятора (Таблица 19). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о формировании ОС в опухолевых клетках линии P19 при действии блокатора SH-групп пептидов и белков в условиях нормоксии, способствующего необратимой окислительной модификации белков – карбонилированию. Проведенный корреляционный анализ установил статистически значимую сильную положительную взаимосвязь между величиной соотношения GSH/GSSG и активностью глутатионредуктазы ($r=+0,899$; $p<0,05$), между содержанием GSSG и свободными SH-группами белков ($r=+0,805$; $p<0,05$), а также статистически значимую сильную отрицательную взаимосвязь между величиной соотношения GSH/GSSG и концентрацией гидроксильного радикала ($r=-0,892$; $p<0,05$), между содержанием GSSG и

концентрацией карбонильных производных белков (r=-0,872; p<0,05) в опухолевых клетках линии P19 при воздействии NEM в условиях нормоксии. Зафиксированный дисбаланс системы глутатиона и активация как обратимой, так и необратимой окислительной модификации белков способствовали стимуляции рецепторного и митохондриального пути апоптоза в изучаемых клетках при нормоксии и добавлении в среду инкубации блокатора SH-групп пептидов и белков, что выражалось в статистически значимом увеличении числа аннексин-, Fas-, TNF RI-положительных и клеток со сниженным митохондриальным потенциалом на фоне значимого увеличения внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+} относительно показателей, полученных при нормоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Таблица 12, 13, 14). Полученные данные подтверждают предположение о том, что в редокс-регуляции рецепторного и митохондриального пути апоптоза участвуют сульфгидрильные группы молекул рецепторов клеточной смерти. N-этилмалеимид, являясь производным малеиновой кислоты, содержит имидную функциональную группу и представляет собой активированный алкен, способный реагировать с тиолами. Это соединение может предотвращать вызываемую VEGF пролиферацию эндотелиальных клеток, подавляя, таким образом, васкуляризацию опухоли [30]. Другим молекулярным механизмом его избирательного воздействия на опухолевые клетки является предотвращение активации экспрессии гена *ABCB1*, продуктом которого является гликопротеин P. Гликопротеин P или белок множественной лекарственной устойчивости 1 (permeability glycoprotein, P-glycoprotein 1) является важным АТФ-зависимым мембранным насосом с широкой субстратной специфичностью, выкачивающим многие ксенобиотики из клетки [274]. Можно предположить, что в основе вызываемого NEM предотвращения активации экспрессии гена *ABCB1* лежат редокс-зависимые молекулярные механизмы [248]. Действительно, экспрессия гена *ABCB1* регулируется при участии ряда факторов транскрипции, в том числе редокс-чувствительных, например, p53 и NF-κB. Кроме того, было показано влияние MAPK-зависимых сигнальных путей на регуляцию экспрессии

гликопротеина P [212]. Эффект NEM также опосредован ингибированием протеинкиназы C-α (protein kinases C-α, PKC-α) [242].

Воздействие DTE в условиях нормоксии на опухолевые клетки линии P19 сопровождалось статистически значимым снижением продукции АФК (H_2O_2) и увеличением содержания $HO^{\bullet}$ относительно результатов, полученных при нормоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Таблица 15). Содержание общего глутатиона в опухолевых клетках линии P19 при нормальном напряжении кислорода и добавлении в среду инкубации DTE статистически значимо возрастало за счет GSH, что способствовало повышению активности глутатионпероксидазы относительно показателей, полученных при нормоксии без воздействия DTE (Таблица 16). Содержание свободных SH-групп белков при воздействии DTE статистически значимо снижалось по сравнению с показателем, полученном при нормоксии без добавления в среду инкубации указанного редокс-модулятора (Таблица 17). Следует отметить, что при воздействии протектора SH-групп пептидов и белков статистически значимо увеличивалось количество клеток, несущих на своей поверхности TNF RI и Fas-рецепторы, а также число клеток со сниженным митохондриальным потенциалом на фоне увеличения внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+} относительно данных, полученных в клетках, инкубированных при нормальном напряжении кислорода и без воздействия указанного редокс-модулятора (Таблица 13, 14). Однако в аннексиновом тесте отмечалась только тенденция к повышению числа аннексин-положительных клеток и их процент был сопоставимым со значением, полученном при нормоксии без воздействия DTE (Таблица 12). Выполненный корреляционный анализ позволил выдвинуть предположение о влиянии редокс-статуса системы глутатиона на презентацию TNF RI опухолевых клеток линии P19 при воздействии DTE в условиях нормоксии посредством установленной статистически значимой сильной положительной взаимосвязи между количеством TNF RI-положительных клеток и активностью глутатионпероксидазы ($r=+0,875$; $p<0,05$).

В ответ на дополнительное внесение NAC в среду инкубирования опухолевых клеток линии P19 нами было получено статистически значимое снижение содержания свободных SH-групп белков, сопровождающееся увеличением числа аннексин- и Fas-положительных клеток, а также клеток со сниженным митохондриальным потенциалом на фоне возрастания внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} по сравнению с показателями, полученными в клетках при нормоксии без добавления в среду инкубации указанного редокс-модулятора (Таблица 12, 13, 14, 17). Предшественник синтеза глутатиона способен быстро проникать в клетку. Эта молекула преимущественно служит субстратом для эндогенных эстераз, высвобождающих L-цистеин, являющийся предшественником в синтезе глутатиона [103]. Кроме того, NAC может восстанавливать дисульфидные связи в молекулах белков [208].

В условиях гипоксии дополнительное добавление в среду инкубации опухолевых клеток линии P19 блокатора SH-групп пептидов и белков сопровождалось статистически значимым снижением содержания общего глутатиона преимущественно за счет восстановленной формы тиола, однако концентрация GSSG была выше относительно соответствующих значений, полученных в клетках, инкубированных при гипоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Таблица 16). При этом в условиях воздействия NEM в опухолевых клетках линии P19 при сниженной концентрации кислорода увеличение содержания окисленной формы тиола способствовало статистически значимому снижению величины соотношения восстановленного глутатиона к окисленному относительно значения, полученного при гипоксии без добавления в среду инкубации NEM (Таблица 17). Причиной статистически значимого возрастания концентрации GSSG в опухолевых клетках линии P19 при изучаемом воздействии вероятнее всего была сниженная активность глутатионредуктазы относительно показателя, полученного в клетках, инкубированных при гипоксии и без указанного редокс-модулятора (Таблица 18). Кроме этого, необходимо отметить, что в этих условиях инкубации опухолевые клетки линии P19

характеризовались статистически значимым снижением концентрации АФК (H_2O_2) и сопоставимым содержанием $HO^{\bullet}$ относительно результатов, полученных в клетках, инкубированных при гипоксии без воздействия блокатора SH-групп пептидов и белков (Таблица 15). Установленный факт, вероятнее всего, является следствием усиленного расхода GSH на утилизацию АФК. Однако, в опухолевых клетках линии P19 в условиях гипоксии и при дополнительном воздействии NEM было зафиксировано статистически значимое увеличение содержания карбонильных производных белков относительно показателя, полученного в клетках, инкубированных при гипоксии без добавления указанного редокс-модулятора (Таблица 19). Статистически значимого изменения концентрации свободных SH-групп белков и белково-связанного глутатиона в опухолевых клетках линии P19 при изучаемом воздействии в условиях гипоксии нами не установлено (Таблица 17, 19). Дисбаланс системы глутатиона и накопление карбонильных производных белков в опухолевых клетках линии P19, инкубированных в условиях гипоксии и дополнительного внесения NEM, сопровождались активацией как рецепторного, так и митохондриального пути апоптоза. Это выражалось в статистически значимом увеличении внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+}, количества аннексин-, TNF RI-, Fas-положительных опухолевых клеток линии P19, а также клеток со сниженным митохондриальных потенциалом, инкубированных при гипоксии и дополнительном добавлении NEM, по сравнению с результатами, полученными при гипоксии без воздействия блокатора SH-групп пептидов и белков (Таблица 12, 13, 14). При проведении корреляционного анализа полученных результатов в опухолевых клетках линии P19 в условиях гипоксии и действии NEM нами были установлены статистически значимая сильная положительная корреляция между содержанием GSSG и концентрацией свободных SH-групп белков ($r=+0,882$; $p<0,05$) и отрицательная взаимосвязь между количеством аннексин-положительных клеток и содержанием свободных SH-групп белков ($r=-0,853$; $p<0,05$).

При дополнительном внесении DTE в среду инкубирования опухолевых клеток линии Р19 в условиях гипоксии нами было установлено статистически значимое увеличение концентрации общего глутатиона (за счет фракции восстановленной формы тиола) и свободных SH-групп белков на фоне снижения содержания белково-связанного глутатиона по сравнению с результатами, полученными при гипоксии без добавления указанного редокс-модулятора (Таблица 16, 17, 19). В работе глутатион-зависимых ферментов наблюдался дисбаланс: активность глутатионредуктазы статистически значимо снижалась, а активность глутатионпероксидазы, наоборот, увеличивалась относительно значений, полученных в клетках, инкубированных при гипоксии без воздействия протектора SH-групп пептидов и белков (Таблица 18). Разнонаправленное изменение содержания свободных SH-групп белков и активности глутатионредуктазы при указанных условиях инкубирования опухолевых клеток линии Р19 было отражено в виде статистически значимой сильной отрицательной корреляции между этим показателями ($r=-0,891$; $p<0,05$). Дополнительное внесение в среду инкубации DTE способствовало статистически значимому снижению внутриклеточной концентрации АФК (H_2O_2) и $HO^{\bullet}$ в опухолевых клетках линии Р19 относительно показателей, полученных в клетках, инкубированных при гипоксии без DTE (Таблица 15). Установленные изменения в системе глутатиона сопровождались статистически значимым снижением содержания ионов Ca^{2+}, количества аннексин-положительных и клеток со сниженным митохондриальных потенциалом, инкубированных при сниженном напряжении кислорода и дополнительном добавлении DTE, по сравнению с результатами, полученными в опухолевых клетках линии Р19 при гипоксии без воздействия протектора SH-групп пептидов и белков (Таблица 13). Однонаправленное снижение содержания АФК и количества аннексин-положительных опухолевых клеток линии Р19 при гипоксии и воздействии протектора SH-групп пептидов и белков выражалось в виде установленной нами сильной статистически значимой положительной взаимосвязи этих показателей

(r=+0,871; p<0,05). Кроме этого, в опухолевых клетках линии Р19 при дополнительном добавлении в среду инкубации DTE и в условиях гипоксии выявлена сильная статистически значимая отрицательная корреляция между содержанием свободных SH-групп и числом клеток со сниженным митохондриальным потенциалом (r=-0,899; p<0,05). Таким образом, DTE вызывало увеличение жизнеспособности, что сопровождалось в большей степени антиоксидантным эффектом на опухолевые клетки линии Р19 в условиях гипоксии. Вероятнее всего такое возможно благодаря тому, что DTE может участвовать в реакциях тиол-дисульфидного обмена, преимущественно восстанавливая смешанные дисульфиды (белок-SSG). Одним из основных молекулярных механизмов воздействия DTE на клетки является изменением редокс-гомеостаза, необходимого для формирования дисульфидных связей и фолдинга белков. Протекающие процессы фолдинга и транспорта белков зависят в норме от работы Ca^{2+}-зависимых шаперонов: GRP 78 и GRP 94 [144]. Было показано, что повышение экспрессии GRP 78 или протеин-дисульфидизомеразы защищает клетки от гибели при гипоксии, ОС или нарушении гомеостаза ионов Ca^{2+} [123]. Таким образом, формирование гипоксии может приводить к модуляции экспрессии Ca^{2+}-зависимых шаперонов и адаптации опухолевых клеток к изменениям редокс-статуса клетки.

При добавлении предшественника синтеза глутатиона – NAC в среду инкубирования опухолевых клеток линии Р19 в условиях гипоксии нами было установлено статистически значимое увеличение внутриклеточного содержания общего глутатиона, свободных SH-групп белков на фоне снижения концентрации белково-связанного глутатиона и карбонильных производных протеинов, ионов Ca^{2+} и числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, а также ингибирования активности глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы по сравнению с результатами, полученными при гипоксии без добавления указанного редокс-модулятора (Таблица 16, 17, 18, 19). При проведении корреляционного анализа полученных результатов в опухолевых клетках линии

P19 в условиях действия предшественника синтеза глутатиона и гипоксии нами была установлена статистически значимая сильная отрицательная корреляция между содержанием ионов Ca^{2+} и концентрацией свободных SH-групп ($r=-0,809$; $p<0,05$). Действие NAC на опухолевые клетки P19 в условиях гипоксии было сопряжено с антиоксидантным эффектом – так нами было зафиксировано статистически значимое снижение содержания АФК (H_2O_2) относительно показателя при гипоксии без добавления предшественника синтеза глутатиона (Таблица 15). Однако на выживаемость в аннексиновом тесте изучаемых клеток в условиях гипоксии NAC не оказывал влияния (Таблица 12).

При анализе полученных данных нами было установлено, что действие NEM в опухолевых клетках линии P19 в условиях гипоксии сопровождалось увеличением продукции АФК, карбонилирования белков и проапоптотическим эффектом, выражавшемся в статистически значимом возрастании числа аннексин-положительных клеток, концентрации ионов Ca^{2+} и карбонильных производных белков на фоне угнетения активности глутатионпероксидазы по сравнению с результатами, полученными при нормоксии и дополнительном добавлении блокатора SH-групп пептидов и белков (Таблица 12, 13, 15, 18, 19).

В опухолевых клетках линии P19 при гипоксии в условиях действия протектора SH-групп пептидов и белков было зафиксировано статистически значимое снижение числа TNF RI-положительных, клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, содержания ионов Ca^{2+}, GSH, на фоне увеличения аннексин-положительных клеток, концентрации АФК (H_2O_2), карбонильных производных белков, белково-связанного глутатиона, активности глутатионредуктазы относительно показателей, полученных в условиях нормоксии и дополнительного внесения DTE (Таблица 12, 13, 14, 15, 18, 19). Таким образом, протектор SH-групп пептидов и белков в условиях гипоксии способствовал снижению окислительной модификации белков, а повышенная активность глутатионредуктазы не могла обеспечить высокий уровень GSH, что отражалось на увеличении содержания АФК (H_2O_2).

Дополнительное добавление NAC в среду инкубации опухолевых клеток линии Р19 при гипоксии сопровождалось статистически значимым возрастанием количества аннексин-положительных клеток и содержания ионов Ca^{2+}, АФК (H_2O_2, $HO^{\bullet}$), белково-связанного глутатиона на фоне сниженной активности глутатионпероксидазы и числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом относительно результатов, полученных в условиях нормоксии и NAC (Таблица 12, 13, 15, 18, 19). Действие предшественника синтеза глутатиона в опухолевых клетках линии Р19 при гипоксии не защищало их от формирования более сильного ОС, сопровождалось накоплением обратимо окислительно-модифицированных белков и проапоптотическим эффектом.

Заключение

Нарушение регуляции апоптотической гибели сопряженное с формированием ОС является одним из звеньев патогенеза опухолевого роста [16, 69, 109, 128, 163]. Значительный вклад в регуляцию и реализацию процесса программированной клеточной гибели вносят митохондрии. В условиях гипоксии в опухолевых клетках происходит усиление генерации АФК и усугубление ОС [105, 159, 184, 209]. Низкое напряжение кислорода способствует формированию дисфункции митохондрий и выступает дополнительным фактором, усугубляющим ОС в опухолевой клетке. Снижение в клетке концентрации конечного акцептора электронов – кислорода, способствует ингибированию активности цитохромоксидазы и является причиной утечки электронов из дыхательной цепи митохондрий, сопровождающейся усиленной генерацией АФК. Поэтому нарушение функционирования митохондрий рассматривается основной причиной развития ОС в клетке и может влиять на реализацию апоптоза по митохондриальному пути [169, 190, 218]. Основными АФК, которые образуются в результате этого процесса, являются супероксидный анион-радикал и пероксид водорода [112, 121, 169]. Окислительный стресс способствует развитию окислительной модификации белков, отвечающих за активацию метаболических и сигнальных путей, в том числе в реализации и регуляции апоптоза клетки [148, 221, 223]. Поэтому особое внимание заслуживает изучение триггерных механизмов клеточной гибели опухолевых клеток в условиях гипоксии. В этом случае опухолевая клетка характеризуется нарушением апоптотической гибели [206]. Дизрегуляция апоптоза на фоне снижения концентрации кислорода неизбежно сопряжена с изменением редокс-статуса в опухолевых клетках [154, 169, 266].

Компоненты системы глутатиона являются важными регуляторами редокс-гомеостаза клетки. Их участие опосредовано формированием дисульфидных связей с SH-группами белков, которые способствуют изменению функциональной

активности протеинов [79, 127, 147, 148]. Чрезмерная выработка АФК способствует как обратимой – глутатионилирование, так и необратимой модификации белков – карбонилирование. В процесс ковалентной модификации могут быть вовлечены ключевые белки-регуляторы клеточного цикла, факторы транскрипции, ион-транспортирующие системы, способствующие нарушению метаболизма, дифференцировки и программированной гибели опухолевой клетки [42, 221].

Нами было показано усиление ОС на фоне дисбаланса функционирования системы глутатиона. При моделировании условий гипоксии в опухолевых клетках линии Р19 развитие ОС происходило преимущественно за счет накопления гидроксильного радикала. Это приводило к снижению редокс-статуса системы глутатиона (снижение концентрации общего глутатиона за счет восстановленной формы тиола, свободных SH-групп белков, увеличение активности глутатионредуктазы и снижение – глутатионпероксидазы) и активации как обратимой, так и необратимой окислительной модификации протеинов. С другой стороны, дисбалансу системы глутатиона могла способствовать окислительная модификация белков. Избыточное накопление окислительно-модифицированных белков в условиях гипоксии в опухолевых клетках линии Р19 сопровождалось активацией программированной клеточной гибели преимущественно по митохондриальному пути (увеличение содержания ионов Ca^{2+}, числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом и аннексин-положительных клеток) (Рисунок 5).

В проведенном исследовании при помощи ингибиторного анализа в условиях нормоксии нами было показано, что самый мощный апоптоз-индуцирующий эффект зафиксирован при дополнительном добавлении в среду инкубирования опухолевых клеток линии Р19 блокатора SH-групп пептидов и белков – NEM. При этом активация апоптоза в этих клетках происходила как за счет рецепторного, так и митохондриального пути на фоне установленного выраженного ОС (накопление гидроксильного радикала), активации обратимой и

необратимой окислительной модификации белков и снижения редокс-статуса системы глутатиона (снижение концентрации общего глутатиона за счет восстановленного глутатиона, свободных SH-групп белков, увеличение активности глутатионпероксидазы и снижение – глутатионредуктазы). В условиях моделирования гипоксии и блокирования SH-групп пептидов и белков усиливался дисбаланс системы глутатиона (снижение концентрации восстановленного глутатиона и активности глутатионредуктазы наряду с увеличением содержания окисленного глутатиона), что способствовало активации апоптоза в опухолевых клетках линии Р19 преимущественно за счет необратимой окислительной модификации белков клетки.

Рисунок 5 – Молекулярные механизмы участия системы глутатиона и окислительной модификации белков в нарушении регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Р19 (тератокарцинома мыши С3Н/Не) в условиях моделирования гипоксии (по данным [159, 209, 215, 221] (выделено серым цветом) и результатам собственных исследований)

Воздействие протектора SH-групп пептидов и белков (DTE) в условиях нормоксии в опухолевых клетках линии Р19 вызывало активацию рецепторного и

митохондриального пути апоптоза посредством изменения редокс-статуса системы глутатиона и концентрации свободных SH-групп белков. При гипоксии восстановление SH-групп пептидов и белков в опухолевых клетках линии Р19 способствовало антиапоптотическому эффекту на фоне увеличения содержания восстановленного глутатиона и свободных SH-групп белков, снижения концентрации гидроксильного радикала и белково-связанного глутатиона, а также снижения активности глутатионредуктазы и возрастания активности глутатионпероксидазы.

При действии предшественника синтеза глутатиона – NAC, в условиях нормального напряжения кислорода в опухолевых клетках линии Р19 апоптоз-активирующий эффект был преимущественно опосредован снижением содержания свободных SH-групп белков на фоне возрастания внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} и увеличения презентации Fas-рецептора на мембране клеток. Однако, в условиях гипоксии установлено протекторное влияние NAC в опухолевых клетках линии Р19, что выражалось в увеличении концентрации свободных SH-групп белков, снижении обратимой и необратимой окислительной модификации белков на фоне антиапоптотического эффекта (уменьшение числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом и концентрации ионов Ca^{2+}).

Согласно полученным данным, можно сделать заключение, что в условиях гипоксии в опухолевых клетках линии Р19 изменение редокс-статуса системы глутатиона и содержания окислительно-модифицированных белков (глутатионилирование и карбонилирование) влияет на метаболизм опухолевой клетки в целом и способствует нарушению реализации клеточной гибели (Рисунок 5).

Разнонаправленные эффекты реализации апоптоза в опухолевых клетках линии Р19 при действии редокс-модуляторов в условиях нормального и сниженного напряжения кислорода требовали выявления молекулярных механизмов нарушения регуляции программированной гибели опухолевых

клеток. Выполненное нами исследование установило участие редокс-статуса опухолевой клетки в механизмах программированной клеточной гибели, при этом сульфгидрильные группы белков являются молекулярными мишенями для реакций тиоляции-детиоляции с участием окисленного глутатиона. Наряду с этим белки представляют собой субстраты для карбонилирования, что способствовало, в условиях изменения редокс-статуса и напряжения кислорода, необратимой окислительной модификации и изменению их функции.

Таким образом, нами были установлены молекулярные механизмы участия системы глутатиона и окислительно-модифицированных белков в нарушении регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Р19 как при нормоксии, так и в условиях гипоксии. Полученные данные могут стать основой для разработки технологии таргетного управления апоптозом при опухолевом росте.

Выводы

1. Нарушение регуляции апоптоза в клетках линии P19 (тератокарцинома мыши C3H/He) в условиях гипоксии сопряжено с усилением продукции активных форм кислорода, дисбалансом в системе глутатиона, активацией обратимой и необратимой окислительной модификации белков.

2. Активация рецепторного и митохондриального путей апоптоза клеток линии P19 (тератокарцинома мыши C3H/He) при нормальном напряжении кислорода в условиях блокирования SH-групп пептидов и белков сопряжена с увеличением содержания ионов Ca^{2+}, гидроксильного радикала, накоплением карбонильных производных белков, белково-связанного глутатиона, снижением концентрации восстановленного глутатиона, свободных SH-групп белков, активности глутатионредуктазы на фоне возрастания активности глутатионпероксидазы.

3. При моделировании гипоксии в условиях блокирования SH-групп пептидов и белков увеличение числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, TNF RI-, Fas- и аннексин-положительных клеток линии P19 (тератокарцинома мыши C3H/He) сопровождается увеличением содержания ионов Ca^{2+}, карбонильных производных белков, окисленного глутатиона на фоне снижения концентрации восстановленного глутатиона и активности глутатионредуктазы.

4. В условиях нормального напряжения кислорода и восстановления SH-групп пептидов и белков увеличение числа TNF RI-, Fas-положительных и клеток линии P19 (тератокарцинома мыши C3H/He) со сниженным митохондриальным потенциалом сопряжено с увеличением содержания ионов Ca^{2+}, гидроксильного радикала, восстановленного глутатиона, активности глутатионпероксидазы на фоне снижения концентрации свободных SH-групп белков.

5. Уменьшение числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом и аннексин-положительных клеток линии P19 (тератокарцинома

мыши C3H/He) при моделировании гипоксии в условиях восстановления SH-групп пептидов и белков сопровождается снижением содержания ионов Ca^{2+}, гидроксильного радикала, белково-связанного глутатиона, активности глутатионредуктазы на фоне увеличения концентрации восстановленного глутатиона, свободных SH-групп белков и активности глутатионпероксидазы.

6. Возрастание экспрессии Fas-рецепторов на плазматической мембране и числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, аннексин-положительных клеток линии P19 (тератокарцинома мыши C3H/He) при нормоксии в условиях действия предшественника синтеза глутатиона сопровождается увеличением содержания ионов Ca^{2+} и снижением концентрации свободных SH-групп белков.

7. Уменьшение процента клеток линии P19 (тератокарцинома мыши C3H/He) со сниженным митохондриальным потенциалом при моделировании гипоксии в условиях действия предшественника синтеза глутатиона сопряжено со снижением содержания ионов Ca^{2+}, белково-связанного глутатиона, карбонильных производных белков, активности глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы на фоне увеличения концентрации свободных SH-групп белков и активности.

8. Молекулярными механизмами активации рецепторного и митохондриального путей апоптоза в условиях модуляции редокс-статуса с помощью блокатора SH-групп пептидов и белков в опухолевых клетках линии P19 (тератокарцинома мыши C3H/He) при нормоксии являются глутатионилирование и карбонилирование белков, а при гипоксии – преимущественно карбонилирование протеинов.

9. Проапоптотический эффект (активация рецепторного и митохондриального путей апоптоза) редокс-модулирования (5 мМ 1,4-дитиоэритритол и 5 мМ N-ацетилцистеин) в опухолевых клетках линии P19 (тератокарцинома мыши C3H/He) при нормоксии опосредован участием свободных SH-групп белков. В условиях гипоксии в опухолевых клетках линии

P19 (тератокарцинома мыши C3H/He) при модуляции редокс-статуса ингибирование апоптоза сопряжено со снижением содержания глутатионилированных и карбонильных производных белков при использовании предшественника синтеза глутатиона, а при применении протектора SH-групп пептидов и белков – только концентрацией белково-связанного глутатиона.

Список сокращений

АФК – активные формы кислорода,

белок-SSG – белково-связанный глутатион,

ГЛЮТ-1 – транспортер глюкозы-1,

ДМСО – диметилсульфоксид,

ДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразин,

ДТНБ – 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойная кислота),

ДХФ – 2,7-дихлорфлуоресцин,

ДХФ-ДА – 2,7-дихлорфлуоресцеин-3,6-диацетат,

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный,

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный,

ОС – окислительный стресс,

СОД – супероксиддисмутаза,

ТНБ – 5'-тио-2-нитробензойная кислота,

ТХУ – трихлоруксусная кислота,

у.е. – условные единицы,

$ФАДН_2$ – флавинадениндинуклеотид восстановленный,

$ФМНН_2$ – флавинмононуклеотид восстановленный,

ФНО – фактор некроза опухоли,

ЭДТА-Na – этилендиаминтетраацетат Na,

ЭПР – эндоплазматический ретикулум,

AIF – apoptosis inducing factor, апоптоз-индуцирующий фактор,

Apaf-1 – apoptosis protease activating factor 1, фактор активации протеаз-1,

Bcl-2 – белки-регуляторы апоптоза В-клеток лейкемии-2,

BID – BH3-interacting domain death agonist, BH3-взаимодействующий домен смерти белка-агониста,

BIR – Baculoviral IAP repeat domains, повторяющиеся домены IAP бакуловируса,

CD95/Fas (cluster of differentiation 95 – поверхностный кластер дифференцировки 95/апоптозный антиген 1),

c-FLIP – cellular FADD-like interleukin-1β converting enzyme inhibitory protein, клеточный ингибитор протеинов,

CREB – cAMP response element-binding protein binding protein, цАМФ респонсивный элемент связывающий белок,

CXCR4 – C-X-C motif chemokine receptor type 4, рецептор 4 для хемокинов подсемейства CXC,

DED – death-effector domain, домен эффектора смерти,

DIABLO – direct IAP binding protein with low PI, прямо связывающий ингибитор апоптоз-специфических протеаз,

DISC – death-inducing signaling complex, сигнальный комплекс, запускающий гибель клетки,

DR – death receptor, смерть-передающий рецептор,

DTE – 1,4-дитиоэритритол,

EPO – erythropoietin, эритропоэтин,

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

FADD – Fas-associated death domain, белок, взаимодействующий с доменом смерти рецептора Fas,

FasL – Fas ligand, Fas лиганд,

FIH – factor inhibiting HIF-1, фактор, ингибирующий гипоксия-индуцибельный фактор-1,

FITC – флюоресцеин изотиоционат,

FSC – forward scatter, малое угловое светорассеивание,

GFR – epidermal growth factor receptor, рецептор эпидермального фактора роста,

GRP – glucose-regulated protein, глюкозорегулируемый белок (шаперон),

GSH – восстановленный глутатион,

GSSG – окисленный глутатион,

GS-ТНБ – 5'-тио-2-нитробензойная кислота-окисленный глутатион,

HIF – hypoxia inducible factors, гипоксия-индуцибельный фактор,

HIV-1 – human immunodeficiency virus 1, вирус иммунодефицита человека 1,

HREs – hypoxia-responsive elements, гипоксия-респонсивный элемент,

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

IGF-2 – insulin-like growth factor-2, инсулиноподобный фактор роста 2,

IP3R – inositol-1,4,5-triphosphate receptors, рецепторы к инозитол-1,4,5-трифосфату,

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

KPE – калий-фосфатный буфер,

MPTP – mitochondrial permeability transition pore, митохондриальные поры,

mTOR – mammalian target of rapamycin kinase, киназа млекопитающих рапамицин-ассоциированная мишень,

MTT – 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид,

n – размер выборки,

NAC – N-ацетилцистеин,

NCX – Na^+/Ca^{2+} exchanger, Na^+/Ca^{2+} обменник,

NEM – N-этилмалеимид,

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

PBS – натрий-фосфатный буфер,

P-glycoprotein 1 – permeability glycoprotein, белок множественной лекарственной устойчивости 1,

PHD – prolyl hydroxylase domain proteins, белковые домены пролилгидроксилазы,

PI – пропидия йодид,

PKC-α – protein kinases C-α, протеинкиназы C-α,

PMCA – plasma membrane Ca^{2+}-ATPase, Ca^{2+}-АТФаза, расположенная на плазмолемме,

PTP – protein tyrosine phosphatases, протеинтирозинфосфатаза,

pVHL – von Hippel-Lindau protein, белок фон Гиппеля-Линдау,

ROC – receptor-operated channels, лигандуправляемые кальциевые каналы,

RyR – ryanodine receptors, рианодиновые рецепторы,

SERCA – sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase pumps, саркоплазматическая Ca^{2+}-АТФаза,

Smac – second mitochondria derived activator of caspases, вторичный митохондриальный активатор каспаз

SSC – side scatter, боковое светорассеивание,

TGF-α – transforming growth factor-α, трансформирующий фактор роста α,

TL1A – tumor necrosis factor-like cytokine 1A, фактор некроза опухоли, подобный цитокину 1А,

TNF – tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли,

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

TRADD – TNF RI-associated death domain, белок, взаимодействующий с доменом смерти рецептора TNF RI,

TRAIL – tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, фактор некроза опухоли-зависимый апоптоз-индуцирующий лиганд,

UPR – unfolded protein response, респонсивные белки,

VEGF – vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов,

VOC – voltage-operated channels, потенциалуправляемых кальциевые каналы,

$\Delta\Psi$ – трансмембранный потенциал митохондрий.

Список литературы

1. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты организма / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина. – СПб. : ИКФ «Фолиант», 2000. – 104 с.

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

3. 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.

4. 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.

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

6. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. – М. : ФГБУ МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. – 252 с.

7. Кобляков, В.А. Гипоксия и гликолиз как возможные объекты противоопухолевого воздействия / В.А. Кобляков // Успехи молекулярной онкологии. – 2014. – № 2. – С. 44–49.

8. Куликов, В.А. Метаболическое перепрограммирование раковых клеток / В.А. Куликов, Л.Е. Беляева // Вестник ВГМУ. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 6–18.

9. Куликов, В.А. О биоэнергетике опухолевой клетки / В.А. Куликов, Л.Е. Беляева // Вестник ВГМУ. – 2015. – Т. 14, № 6. – С. 5–14.

10. Кулинский, В.И. Глутатион ядра клетки и его функции / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, № 6. – С. 657–662.

11. Кулинский, В.И. Система глутатиона I. Синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55, № 3. – С. 255–277.

12. Марусова, Т.А. Метаболизм глюкозы раковых клеток как мишень в противоопухолевой терапии / Т.А. Марусова, М.В. Иготти // Цитология. – 2020. – Т. 62, № 11. – С. 773–781.

13. Медицинские лабораторные технологии : в 2 т. / под ред. А.И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 1998. – Т. 2. – 656 с.

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

15. Окислительно-антиокислительная система организма человека, роль в развитии патологического процесса и его коррекции / Л.П. Рыбакова, Л.Р. Алексанян, С.И. Капустин, С.С. Бессмельцев // Вестник гематологии. – 2022. – Т. 18, № 4. – С. 26–37.

16. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин [и др.] – Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2017. – 284 с.

17. Октябрьский, О.Н. Редокс-регуляция клеточных функций / О.Н. Октябрьский, Г.В. Смирнова // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 2. – С. 158–174.

18. Роль окислительной модификации белков в редокс-регуляции активности каспазы-3 в лимфоцитах крови при окислительном стрессе *in vitro* / О.Л. Носарева, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – Т. 14, № 6. – С. 61–67.

19. Роль редокс-потенциала системы глутатиона в дисрегуляции апоптоза клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 / Е.В. Шахристова,

Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160, № 9. – С. 351–354.

20. Роль редокс-статуса и окислительной модификации белков в реализации апоптоза лимфоцитов крови человека в норме и при экспериментальном окислительном стрессе / О.Л. Носарева, Е.А. Степовая, Е.В. Шахристова [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2019. – Т. 105, № 3. – С. 327–338.

21. Система антиоксидантной защиты: регуляция метаболических процессов, генетические детерминанты, методы определения / О.А. Никитина, М.А. Даренская, Н.В. Семенова, Л.И. Колесникова // Сибирский научный медицинский журнал. – 2022. – Т. 42, № 3. – С. 1–17.

22. Черненко, И.Н. Дисфункция митохондрий как критерий патогенеза заболеваний / И.Н. Черненко, А.О. Михайлов, Н.Г. Плехова // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2022. – Т. 24, № 10. – С. 114–119.

23. A method for detection of overoxidation of cysteines: peroxiredoxins are oxidized *in vivo* at the active-site cysteine during oxidative stress / E. Wagner, S. Luche, L. Penna [et al.] // Biochem. J. – 2002. – Vol. 366, Pt. 3. – P. 777–785.

24. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase / S. Melov, J.A. Schneider, B.J. Day [et al.] // Nat. Genet. – 1998. – Vol. 18 (2). – P. 159–163.

25. Aconitases: Non-redox iron-sulfur proteins sensitive to reactive species / L. Castro, V. Tórtora, S. Mansilla, R. Radi // Acc. Chem. Res. – 2019. – Vol. 52 (9). – P. 2609–2619.

26. 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.

27. Akagawa, M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches / M. Akagawa // Free Radic. Res. – 2021. – Vol. 55 (4). – P. 307–320.

28. An ultrasensitive fluorescent assay for the *in vivo* quantification of superoxide radical in organisms / C.D. Georgiou, I. Papapostolou, N. Patsoukis [et al.] // Anal. Biochem. – 2005. – Vol. 347 (1). – P. 144–151.

29. Analytical methods for assessing thiol antioxidants in biological fluids: A review / I.A. Poimenova, M.M. Sozarukova, D.V. Ratova [et al.] // Molecules. – 2024. – Vol. 29 (18). – P. 4433.

30. Angiogenesis inhibition by the maleimide-based small molecule GNX-686 / P. Nowak-Sliwinska, M. Storto, T. Cataudella [et al.] // Microvasc. Res. – 2012. – Vol. 83 (2). – P. 105–110.

31. Anti-apoptosis and cell survival: A review / L. Portt, G. Norman, C. Clapp [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – Vol. 1813 (1). – P. 238–259.

32. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species // L. He, T. He, S. Farrar [et al.] // Cell. Physiol. Biochem. – 2017. – Vol. 44 (2). – P. 532–553.

33. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer / M. Hassan, H. Watari, A. AbuAlmaaty [et al.] // Biomed. Res. Int. – 2014. – Vol. 2014. – P. 150845.

34. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies / G. Pistritto, D. Trisciuoglio, C. Ceci [et al.] // Aging (Albany NY). – 2016. – Vol. 8 (4). – P. 603–619.

35. Apoptosis detection methods in diagnosis of cancer and their potential role in treatment: advantages and disadvantages: a Review / A. Khodavirdipour, M. Piri, S. Jabbari [et al.] // J. Gastrointest. Cancer. – 2021. – Vol. 52 (2). – P. 422–430.

36. Application of glutathione depletion in cancer therapy: Enhanced ROS-based therapy, ferroptosis, and chemotherapy / B. Niu, K. Liao, Y. Zhou [et al.] // Biomaterials. – 2021. – Vol. 277. – P. 121110.

37. Aryal, B. Specific protein carbonylation in human breast cancer tissue compared to adjacent healthy epithelial tissue / B. Aryal, V.A. Rao // PLoS One. – 2018. – Vol. 13 (3). – P. e0194164.

38. Asantewaa, G. Glutathione and its precursors in cancer / G. Asantewaa, I.S. Harris // Curr. Opin. Biotechnol. – 2021. – Vol. 68. – P. 292–299.

39. Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells / D. Giustarini, G. Colombo, M.L. Garavaglia [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2017. – Vol. 112. – P. 360–375.

40. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis / K. Degenhardt, R. Mathew, B. Beaudoin [et al.] // Cancer Cell. – 2006. – Vol. 10 (1). – P. 51–64.

41. Baba, S.P. Role of thiols in oxidative stress / S.P. Baba, A. Bhatnagar // Curr. Opin. Toxicol. – 2018. – Vol. 7. – P. 133–139.

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

43. Boysen, G. The glutathione conundrum: Stoichiometric disconnect between its formation and oxidative stress / G. Boysen // Chem. Res. Toxicol. – 2017. – Vol. 30 (5). – P. 1113–1116.

44. 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.

45. Brahimi-Horn, M.C. Hypoxia and cancer / M.C. Brahimi-Horn, J. Chiche, J. Pouyssegur // J. Mol. Med. – 2007. – Vol. 85 (12). – P. 1301–1307.

46. Bristow, R.G. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability // R.G. Bristow, R.P. Hill. // Nat. Rev. Cancer. – 2008. – Vol. 8 (3). – P. 180–192.

47. Bruce, J.Ie. Plasma membrane calcium pump regulation by metabolic stress / J.Ie. Bruce // World J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 1 (7). – P. 221–228.

48. Brunelle, J.K. Oxygen deprivation induced cell death: an update / J.K. Brunelle, N.S. Chandel // Apoptosis. – 2002. – Vol. 7 (6). – P. 475–482.

49. 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.

50. Bunik, V.I. Redox-driven signaling: 2-oxo acid dehydrogenase complexes as sensors and transmitters of metabolic imbalance // V.I. Bunik // Antioxid. Redox. Signal. – 2019. – Vol. 30 (16). – P. 1911–1947.

51. Burcham, P.C. Chaperone heat shock protein 90 mobilization and hydralazine cytoprotection against acrolein-induced carbonyl stress / P.C. Burcham, A. Raso, L.M. Kaminskas // Mol. Pharmacol. – 2012. – Vol. 82 (5). – P. 876–886.

52. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis / P. Pinton, C. Giorgi, R. Siviero [et al.] // Oncogene. – 2008. – Vol. 27 (50). – P. 6407–6418.

53. Calcium and apoptosis: facts and hypotheses / R. Rizzuto, P. Pinton, D. Ferrari [et al.] // Oncogene. – 2003. – Vol. 22 (53). – P. 8619–8627.

54. Calcium elevation in mitochondria is the main Ca^{2+} requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening / H.K. Baumgartner, J.V. Gerasimenko, C. Thorne [et al.] // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284 (31). – P. 20796–20803.

55. Calcium signaling and cell proliferation / M.C. Pinto, A.H. Kihara, V.A. Goulart [et al.] // Cell. Signal. – 2015. – Vol. 27 (11). – P. 2139–2149.

56. Cancermetabolism: a therapeutic perspective / U.E. Martinez-Outschoorn, M. Peiris-Pagés, R.G. Pestell [et al.] // Nat. Rev. Clin. Oncol. – 2017. – Vol. 14 (1). – P. 11–31.

57. Carbonylation modification regulates Na/K-ATPase signaling and salt sensitivity: A review and a hypothesis / P.T. Shah, R. Martin, Y. Yan [et al.] // Front. Physiol. – 2016. – Vol. 7. – P. 256.

58. Caspase family proteases and apoptosis / T.J. Fan, L.H. Han, R.S. Cong, J. Liang // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). – 2005. – Vol. 37 (11). – P. 719–727.

59. Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis / D. Milhas, O. Cuvillier, N. Therville [et al.] // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280 (20). – P. 19836–19842.

60. Cell death / K. Newton, A. Strasser, N. Kayagaki, V.M. Dixit // Cell. – 2024. – Vol. 187 (2). – P. 235–256.

61. Cell death / R.S. Hotchkiss, A. Strasser, J.E. McDunn, P.E. Swanson // N. Engl. J. Med. – 2009. – Vol. 361 (16). – P. 1570–1583.

62. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications / L. Galluzzi, M.C. Maiuri, I. Vitale [et al.] // Cell Death. Differ. – 2007. – Vol. 14 (7). – P. 1237–1243.

63. Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation / C.M. Wong, L. Marcocci, L. Liu, Y.J. Suzuki // Antioxid. Redox Signal. – 2010. – Vol. 12 (3). – P. 393–404.

64. Cell stress signaling cascades regulating cell fate / R. Gundamaraju, R. Vemuri, W.C.Chong [et al.] // Curr. Pharm. Des. – 2018. – Vol. 24 (27). – P. 3176–3183.

65. Chao, C.C. Mechanisms of p53 degradation / C.C. Chao // Clin. Chim. Acta. – 2015. – Vol. 438. – P. 139–147.

66. Characterization of mammalian glutaredoxin isoforms as S-denitrosylases / X. Ren, R. Sengupta, J. Lu [et al.] // FEBS Lett. – 2019. – Vol. 593 (14). – P. 1799–1806.

67. Chatterjee, R. ROS and oncogenesis with special reference to EMT and stemness / R. Chatterjee, J. Chatterjee // Eur. J. Cell Biol. – 2020. – Vol. 99 (2-3). – P. 151073.

68. Cheung, E.C. The role of ROS in tumour development and progression / E.C. Cheung, K.H.Vousden // Nat. Rev. Cancer. – 2022. – Vol. 22. – P. 280–297.

69. Chio, I.I.C. ROS in cancer: The burning question / I.I.C. Chio, D.A. Tuveson // Trends. Mol. Med. – 2017. – Vol. 23 (5). – P. 411–429.

70. Ciccarese, F. Escaping death: Mitochondrial redox homeostasis in cancer cells / F. Ciccarese, V. Ciminale // Front. Oncol. – 2017. – Vol. 7. – P. 117.

71. Circu, M.L. Glutathione and modulation of cell apoptosis / M.L. Circu, T.Y. Aw // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – Vol. 1823 (10). – P. 1767–1777.

72. Cotgreave, I.A. Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? / I.A. Cotgreave, R.G. Gerdes // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1998. – Vol. 242 (1). – P. 1–9.

73. D'Arcy, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy / M.S. D'Arcy // Cell Biol. Int. – 2019. – Vol. 43 (6). – P. 582–592.

74. Deng, P. Mitochondrial dysfunction in cancer: Potential roles of ATF5 and the mitochondrial UPR / P. Deng, C.M. Haynes // Semin. Cancer Biol. – 2017. – Vol. 47. – P. 43–49.

75. Depletion of intracellular Ca^{2+} by caffeine and ryanodine induces apoptosis of chinese hamster ovary cells transfected with ryanodine receptor / Z. Pan, D. Damron, A.L. Nieminen [et al.] // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275 (26). – P. 19978–19984.

76. Deponte, M. The incomplete glutathione puzzle: Just guessing at numbers and figures? / M., Deponte // Antioxid. Redox. Signal. – 2017. – Vol. 27 (15). – P. 1130–1161.

77. Desideri, E. Targeting glutathione metabolism: Partner in crime in anticancer therapy / E. Desideri, F. Ciccarone, M.R. Ciriolo // Nutrients. – 2019. – Vol. 11 (8). – P. 1926.

78. Dilek, O. Current probes for imaging carbonylation in cellular systems and their relevance to progression of diseases / O. Dilek // Technol. Cancer Res. Treat. – 2022. – Vol. 21. – P. 15330338221137303.

79. Dominko, K. Glutathionylation: A regulatory role of glutathione in physiological processes / K. Dominko, D. Đikić // Arh. Hig. Rada Toksikol. – 2018. – Vol. 69 (1). – P. 1–24.

80. Edinger, A.L. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy / A.L. Edinger, C.B. Thompson // Curr. Opin. Cell Biol. – 2004. – Vol. 16 (6). – P. 663–669.

81. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death / S. Elmore // Toxicol. Pathol. – 2007. – Vol. 35 (4). – P. 495–516.

82. Endoplasmic reticulum-mitochondria communication through Ca^{2+} signaling: The importance of mitochondria-associated membranes (MAMs) / S. Marchi, M. Bittremieux, S. Missiroli [et al.] // Adv. Exp. Med. Biol. – 2017. – Vol. 997. – P. 49–67.

83. England, K. Direct oxidative modifications of signalling proteins in mammalian cells and their effects on apoptosis / K. England, T.G. Cotter // Redox Rep. – 2005. – Vol. 10 (5). – P. 237–245.

84. ER stress and mitochondrial perturbations regulate cell death in retinal detachment: Exploring the role of HIF1α / B. Kaur, B. Miglioranza Scavuzzi, M. Yang [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2024. – Vol. 65 (11). – P. 39.

85. Exploring the thioredoxin system as a therapeutic target in cancer: Mechanisms and implications / R. Seitz, D. Tümen, C. Kunst [et al.] // Antioxidants (Basel). – 2024. – Vol. 13(9). – P. 1078.

86. Ferroptosis: Process and function / Y. Xie, W. Hou, X. Song [et al.] // Cell Death Differ. – 2016. – Vol. 23 (3). – P. 369–379.

87. Fluctuating and diffusion-limited hypoxia in hypoxia-induced metastasis / E.K. Rofstad, K. Galappathi, B. Mathiesen, E.B. Ruud // Clin. Cancer Res. – 2007. – Vol. 13 (7). – P. 1971–1978.

88. Fong, G.H. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins / G.H. Fong, K. Takeda // Cell Death. Differ. – 2008. – Vol. 15 (4). – P. 635–641.

89. From tissue physoxia to cancer hypoxia, cost-effective methods to study tissue-specific O_2 levels in cellular biology / C.H.V. Nascimento-Filho, A.T. Glinos, Y. Jang [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23 (10). – P. 5633.

90. Functional mitochondria in health and disease / P.M. Herst, M.R. Rowe, G.M. Carson, M.V. Berridge // Front. Endocrinol. (Lausanne). – 2017. – Vol. 8. – P. 296.

91. Fusiform-like copper(II)-based metal-organic framework through relief hypoxia and GSH-depletion co-enhanced starvation and chemodynamic synergetic cancer therapy / Z. Wang, B. Liu, Q. Sun [et al.] // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2020. – Vol. 12 (15). – P. 17254–17267.

92. Ghezzi, P. Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation / P. Ghezzi // Biochem. Soc. Trans. – 2005. – Vol. 33, Pt. 6. – P. 1378–1381.

93. Ghobrial, I.M. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy / I.M. Ghobrial, T.E. Witzig, A.A. Adjei // C.A. Cancer J. Clin. – 2005. – Vol. 55 (3). – P. 178–194.

94. Giaccia, A.J. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease / A.J. Giaccia, M.C. Simon, R. Johnson // Genes Dev. – 2004. – Vol. 18 (18). – P. 2183–2194.

95. Giles, G.I. The redox regulation of thiol dependent signaling pathways in cancer / G.I. Giles // Curr. Pharm. Des. – 2006 – Vol. 12 (34). – P. 4427–4443.

96. Gill, J.G. Cancer, oxidative stress, and metastasis / J.G. Gill, E. Piskounova, S.J. Morrison // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. – 2016. – Vol. 81. – P. 163–175.

97. Girard, P.M. Differential correlations between changes to glutathione redox state, protein ubiquitination, and stress-inducible HSPA chaperone expression after different types of oxidative stress / P.M. Girard, N. Peynot, J.M. Lelièvre // Cell Stress Chaperones. – 2018. – Vol. 23 (5). – P. 985–1002.

98. Glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of mitochondrial membrane thiol proteins: implications for mitochondrial redox regulation and antioxidant DEFENSE / S.M. Beer, E.R. Taylor, S.E. Brown [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279 (46). – P. 47939–47951.

99. Glutathione and glutaredoxin in roscovitine-mediated inhibition of breast cancer cell proliferation / E.V. Shakhristova, E.A. Stepovaya, O.L. Nosareva [et al.] // Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. – 2017. – Vol. 72 (4) – P. 261–267.

100. Glutathione compartmentalization and its role in glutathionylation and other regulatory processes of cellular pathways / A. Scirè, L. Cianfruglia, C. Minnelli [et al.] // Biofactors. – 2019. – Vol. 45 (2). – P. 152–168.

101. Glutathione peroxidase isoenzymes in human tumor cell lines / T. Paukert, R. Sailer, W.S. Strauss [et al.] // Pharmazie. – 2011. – Vol. 66 (11). – P. 894–898.

102. Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases / C. Cao, Y. Leng, W. Huang [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278 (41). – P. 39609–39614.

103. Glutathione supplementation potentiates hypoxic apoptosis by S-glutathionylation of p65-NFkappaB / S. Qanungo, D.W. Starke, H.V. Pai [et al.] //. J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282 (25). – P. 18427–18436.

104. Green, D.R. Cell death: Apoptosis and other means to an end, second edition / D.R. Green. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2018. – 278 p.

105. Guan, L. Newsights of endoplasmic reticulum in hypoxia / L. Guan, R. Ge, S. Ma // Biomed. Pharmacother. – 2024. – Vol. 175. – P. 116812.

106. Halliwell, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism / B. Halliwell // Biochem. Pharmacol. – 1995. – Vol. 49 (10). – P. 1341–1348.

107. 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.

108. Hauck, A.K. Oxidative stress and lipotoxicity / A.K. Hauck, D.A. Bernlohr // J. Lipid Res. – 2016. – Vol. 57 (11). – P. 1976–1986.

109. Helfinger, V. Redox control in cancer development and progression / V. Helfinger, K. Schröder // Mol. Aspects Med. – 2018. – Vol. 63. – P. 88–98.

110. Hematologic malignancies: newer strategies to counter the BCL-2 protein / A.S. Ebrahim, H. Sabbagh, A. Liddane [et al.] // J. Cancer Res. Clin. Oncol. – 2016. – Vol. 142 (9). – P. 2013–2022.

111. Hempel, N. Crosstalk between calcium and reactive oxygen species signaling in cancer / N. Hempel, M. Trebak // Cell Calcium. – 2017. – Vol. 63. – P. 70–96.

112. Herb, M. Reactive oxygen species: Not omnipresent but important in many locations / M. Herb, A. Gluschko, M. Schramm // Front. Cell. Dev. Biol. – 2021. – Vol. 9. – P. 716406.

113. HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs / N.M. Mazure, M.C. Brahimi-Horn, M.A. Berta [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 2004. – Vol. 68 (6). – P. 971–980.

114. HIF-1α-HPRT1 axis promotes tumorigenesis and gefitinib resistance by enhancing purine metabolism in EGFR-mutant lung adenocarcinoma / P. Geng, F. Ye, P. Dou [et al.] // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 2024. – Vol. 43 (1). – P. 269.

115. Hill, R.P. Cancer stem cells, hypoxia and metastasis / R.P. Hill, D.T. Marie-Egyptienne, D.W. Hedley // Semin. Radiat. Oncol. – 2009. – Vol. 19 (2). – P. 106–111.

116. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? / B.J. Aubrey, G.L. Kelly, A. Janic [et al.] // Cell Death Differ. – 2018. – Vol. 25 (1). – P. 104–113.

117. 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.

118. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells / J.M. Heddleston, Z. Li, J.D. Lathia [et al.] // Br. J. Cancer. – 2010. – Vol. 102 (5). – P. 789–795.

119. Hypoxia predisposes neonatal rat ventricular myocytes to apoptosis induced by activation of the Fas (CD95/Apo-1) receptor: Fas activation and apoptosis in

hypoxic myocytes / G. Yaniv, M. Shilkrut, R. Lotan [et al.] // Cardiovasc Res. – 2002. – Vol. 54 (3). – P. 611–623.

120. Immunogenic cell death / A.D. Garg, A.M. Dudek-Peric, E. Romano, P. Agostinis // Int. J. Dev. Biol. – 2015. – Vol. 59 (1-3). – P. 131–140.

121. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy / Z. Zou, H. Chang, H. Li, S. Wang // Apoptosis. – 2017. – Vol. 22 (11). – P. 1321–1335.

122. Influence of oxidative stress on catalytic and non-glycolytic functions of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / V.I. Muronetz, A.K. Melnikova, L. Saso, E.V. Schmalhausen // Curr. Med. Chem. – 2020. – Vol. 27 (13). – P. 2040–2058.

123. Inhibition of autophagic flux by ROS promotes apoptosis during DTT-induced ER/oxidative stress in HeLa cells / X-Y. Xiang, X-C. Yang, J. Su [et al.] // Oncol. Rep. – 2016. – Vol. 35 (6). – P. 3471–3479.

124. Insights into the oligomerization process of the C-terminal domain of human plasma membrane Ca^{2}+-ATPase / F. Benetti, I. Mičetić, F. Carsughi [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 2011. – Vol. 506 (2). – P. 194–200.

125. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins / S.G. Rhee, S.W. Kang, W. Jeong [et al.] // Curr. Opin. Cell Biol. – 2005. – Vol. 17 (2). – P. 183–189.

126. Jayaraman, T. T cells deficient in inositol 1,4,5-triphophate receptor are resistant to apoptosis / T. Jayaraman, A.R. Marks // Mol. Cell. Biol. – 1997. – Vol. – 17 (6). – P. 3005–3012.

127. Kalinina, E. Glutathione in protein redox modulation through S-glutathionylation and S-Nitrosylation / E. Kalinina, M. Novichkova // Molecules. – 2021. – Vol. 26 (2). – P. 435.

128. Kalinina, E.V. Glutathione synthesis in cancer cells / E.V. Kalinina, L.A. Gavriliuk // Biochemistry (Mosc). – 2020. – Vol. 85 (8). – P. 895–907.

129. 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.

130. Kalinina, E.V. S-glutathionylation and S-nitrosylation as modulators of redox-dependent processes in cancer cell / E.V. Kalinina, M.D. Novichkova // Biochemistry (Mosc). – 2023. – Vol. 88 (7). – P. 924–943.

131. Kashyap, D. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis / D. Kashyap, V.K. Garg, N. Goel // Adv. Protein. Chem. Struct. Biol. – 2021. – Vol. 125. – P. 73–120.

132. Kehrer, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity / J.P. Kehrer // Toxicology. – 2000. – Vol. 149 (1). – P. 43–50.

133. Kirtonia, A. The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis / A. Kirtonia, G. Sethi, M. Garg // Cell. Mol. Life Sci. – 2020. – Vol. 77 (22). – P. 4459–4483.

134. Klimova, T. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF / T. Klimova, N.S. Chandel // Cell Death Differ. – 2008. – Vol. 15 (4). – P. 660–666.

135. Knisely, J.P. Importance of hypoxia in the biology and treatment of brain tumors / J.P. Knisely, S. Rockwell // Neuroimaging Clin. N. Am. – 2002. – Vol. 12 (4). – P. 525–536.

136. Knoke, L.R. Global approaches for protein thiol redox state detection / L.R. Knoke, L.I. Leichert // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2023. – Vol. 77. – P. 102390.

137. Kobliakov, V. HIFα as a target for different oncoproteins during carcinogenesis / V. Kobliakov // Advances Mol. Oncol. – 2018. – Vol. 5. – P. 64–71.

138. Księżakowska-Łakoma, K. Mitochondrial dysfunction in cancer / K. Księżakowska-Łakoma, M. Żyła, J.R. Wilczyński // Prz. Menopauzalny. – 2014. – Vol. 13 (2). – P. 136–144.

139. Labrousse-Arias, D. Hypoxia and redox signaling on extracellular matrix remodeling: from mechanisms to pathological implications / D. Labrousse-Arias,

A. Martínez-Ruiz, M.J. Calzada // Antioxid. Redox Signal. – 2017. – Vol. 27 (12). – P. 802–822.

140. Lao, Y. Mobilization of Ca^{2+} from endoplasmic reticulum to mitochondria plays a positive role in the early stage of UV-or TNF-induced apoptosis / Y. Lao, D.C. Chang // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2008. – Vol. 373 (1). – P. 42–47.

141. Lo Conte, M. The redox biochemistry of protein sulfenylation and sulfinylation / M. Lo Conte, K.S. Carroll // J. Biol. Chem. – 2013. – Vol. 288 (37). – P. 26480–26488.

142. Lu, J. The thioredoxin antioxidant system / J. Lu, A. Holmgren // Free Radic. Biol. Med. – 2014. – Vol. 66. – P. 75–87.

143. Lu, J. Thioredoxin system in cell death progression / J. Lu, A. Holmgren // Antioxid. Redox Signal. – 2012. – Vol. 17 (12). – P. 1738–1747.

144. Luo, B. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies / B. Luo, A.S. Lee // Oncogene. – 2013. – Vol. 32 (7). – P. 805–818.

145. Lymphocyte apoptosis: Mediation by increased type 3 inositol 1,4,5-triphosphate receptor / A.A. Khan, M.J. Soloski, A.H. Sharp [et al.] // Science. – 1996. – Vol. 273 (5274). – P. 503–507.

146. MacFarlane, M. Apoptosis and disease: a life or death decision / M. MacFarlane, A.C. Williams // EMBO Rep. – 2004. – Vol. 5 (7). – P. 674–678.

147. Mailloux, R.J. Protein S-glutathionlyation links energy metabolism to redox signaling in mitochondria / R.J. Mailloux, J.R. Treberg // Redox Biol. – 2016. – Vol. 8. – P. 110–118.

148. Mailloux, R.J. Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions / R.J. Mailloux, X. Jin, W.G. Willmore // Redox Biol. – 2013. – Vol. 2. – P. 123–139.

149. Mayevsky, A. Mitochondrial function and energy metabolism in cancer cells: past overview and future perspectives / A. Mayevsky // Mitochondrion. – 2009. – Vol. 9 (3). – P. 165–179.

150. Mechanisms of transcriptional regulation by p53 / K.D. Sullivan, M.D. Galbraith, Z. Andrysik, J.M. Espinosa // Cell Death Differ. – 2018. – Vol. 25 (1). – P. 133–143.

151. Microbial H_2O_2 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.

152. 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.

153. Mitochondria and mitochondrial ROS in cancer: Novel targets for anticancer therapy / Y. Yang, S. Karakhanova, W. Hartwig [et al.] // J. Cell. Physiol. – 2016. – Vol. 231 (12). – P. 2570–2581.

154. Mitochondria and redox homoeostasis as chemotherapeutic targets / M.M. Briehl, M.E. Tome, S.T. Wilkinson [et al.] // Biochem. Soc. Trans. – 2014. – Vol. 42 (4). – P. 939–944.

155. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death / S. Marchi, S. Patergnani, S. Missiroli [et al.] // Cell Calcium. – 2018. – Vol. 69. – P. 62–72.

156. Mitochondrial Ca(2+) and apoptosis / C. Giorgi, F. Baldassari, A. Bononi [et al.] // Cell Calcium. – 2012. – Vol. 52 (1). – P. 36–43.

157. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing / R.D. Guzy, B. Hoyos, E. Robin [et al.] // Cell Metab. – 2005. – Vol. 1 (6). – P. 401–408.

158. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-alpha activation / K.D. Mansfield, R.D. Guzy, Y. Pan [et al.] // Cell Metab. – 2005. – Vol. 1 (6). – P. 393–399.

159. Mitochondrial redox signaling and tumor progression / Y. Chen, H. Zhang, H.J. Zhou [et al.] // Cancers (Basel). – 2016. – Vol. 8 (4). – P. 40.

160. Mitochondrial ROS control of cancer / M.D.P.S. Idelchik, U. Begley, T.J. Begley, J.A. Melendez // Semin. Cancer Biol. – 2017. – Vol. 47. – P. 57–66.

161. Modulation of mitochondrial metabolic reprogramming and oxidative stress to overcome chemoresistance in cancer / R. Avolio, D.S. Matassa, D. Criscuolo [et al.] // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10 (1). – P. 135.

162. Moeller, B.J. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment / B.J. Moeller, R.A. Richardson, M.W. Dewhirst // Cancer Metastasis Rev. – 2007. – Vol. 26 (2). – P. 241–248.

163. Molecular mechanisms behind ROS regulation in cancer: A balancing act between augmented tumorigenesis and cell apoptosis / H.S. Tuli, J. Kaur, K. Vashishth [et al.] // Arch. Toxicol. – 2023. – Vol. 97 (1). – P. 103–120.

164. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment / S. Goldar, M.S. Khaniani, S.M. Derakhshan, B. Baradaran // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2015. – Vol. 16 (6). P. 2129–2144.

165. Molecular ordering of hypoxia-induced apoptosis: critical involvement of the mitochondrial death pathway in a FADD/caspase-8 independent manner / M. Weinmann, V. Jendrossek, R. Handrick [et al.] // Oncogene. – 2004. – Vol. 23 (21). – P. 3757–3769.

166. Møller, I.M. Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective / I.M. Møller, A. Rogowska-Wrzesinska, R.S. Rao // J. Proteomics. – 2011. – Vol. 74 (11). – P. 2228–2242.

167. Moloney, J.N. ROS signalling in the biology of cancer / J.N. Moloney, T.G. Cotter // Semin. Cell Dev. Biol. – 2018. – Vol. 80. – P. 50–64.

168. Multifaceted role of redox pattern in the tumor immune microenvironment regarding autophagy and apoptosis / Y. Ren, R. Wang, S. Weng [et al.] // Mol. Cancer. – 2023. Vol. 22 (1). – P. 130.

169. Munro, D. A radical shift in perspective: mitochondria as regulators of reactive oxygen species / D. Munro, J.R. Treberg // J. Exp. Biol. – 2017. – Vol. 220, Pt. 7. – P. 1170–1180.

170. Musaogullari, A. Redox regulation by protein S-glutathionylation: From molecular mechanisms to implications in health and disease / A. Musaogullari, Y.C. Chai // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21 (21). – P. 8113.

171. NADPH-dependent and -independent disulfide reductase systems / C.G. Miller, A. Holmgren, E.S.J. Arnér, E.E. Schmidt // Free Radic. Biol. Med. – 2018. – Vol. 127. – P. 248–261.

172. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice / R.M. Lebovitz, H. Zhang, H. Vogel [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1996. – Vol. 93 (18). – P. 9782–9787.

173. Neutrophil HIF-1α stabilization is augmented by mitochondrial ROS produced via the glycerol 3-phosphate shuttle / J.A. Willson, S. Arienti, P. Sadiku [et al.] // Blood. – 2022. – Vol. 139. – P. 281–286.

174. Nicholls, D.G. Mitochondrial membrane potential and aging / D.G. Nicholls // Aging Cell. – 2004. – Vol. 3 (1). – P. 35–40.

175. Non-apoptotic caspase regulation of stem cell properties / L.A. Baena-Lopez, L. Arthurton, D.C. Xu, A. Galasso // Semin. Cell Dev. Biol. – 2018. – Vol. 82. – P. 118–126.

176. Non-electron transfer chain mitochondrial defects differently regulate HIF-1α degradation and transcription / A.N. Shvetsova, D. Mennerich, J.M. Kerätär [et al.] // Redox Biol. – 2017. – Vol. 12. – P. 1052–1061.

177. Old, new and emerging functions of caspases / S. Shalini, L. Dorstyn, S. Dawar, S. Kumar // Cell Death Differ. – 2015. – Vol. 22 (4). – P. 526–539.

178. 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.

179. Ou, R. Advancements in the Application of the Fenton Reaction in the Cancer Microenvironment / R. Ou, G. Aodeng, J. Ai // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15 (9). – P. 2337.

180. Oxidative Bax dimerization promotes its translocation to mitochondria independently of apoptosis / M. D'Alessio, M. De Nicola, S. Coppola [et al.] // FASEB J. – 2005. – Vol. 19 (11). – P. 1504–1506.

181. Oxidative modifications in tissue pathology and autoimmune disease / M.L. Yang, H.A. Doyle, S.G. Clarke [et al.] // Antioxid. Redox Signal. – 2018. – Vol. 29 (14). – P. 1415–1431.

182. Oxidative stress and apoptosis after acute respiratory hypoxia and reoxygenation in rat brain / D. Coimbra-Costa, N. Alva, M. Duran [et al.] // Redox. Biol. – 2017. – Vol. 12. – P. 216–225.

183. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? / S. Reuter, S.C. Gupta, M.M. Chaturvedi, B.B. Aggarwal // Free Radic. Biol. Med. – 2010. – Vol. 49 (11). – P. 1603–1616.

184. 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.

185. Oxidative stress-mediated protein sulfenylation in human diseases: Past, present, and future / B. Mu, Y. Zeng, L. Luo, K. Wang // Redox Biol. – 2024. – Vol. 76. – P. 103332.

186. Oxidative stress-modulating drugs have preferential anticancer effects – involving the regulation of apoptosis, DNA damage, endoplasmic reticulum stress, autophagy, metabolism, and migration / J.Y. Tang, F. Ou-Yang, M.F. Hou [et al.] // Semin. Cancer Biol. – 2019. – Vol. 58. – P. 109–117.

187. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation / J.K. Brunelle, E.L. Bell, N.M. Quesada [et al.] // Cell Metab. – 2005. – Vol. 1 (6). – P. 409–414.

188. Oxygen-sensing under the influence of nitric oxide / U. Berchner-Pfannschmidt, S. Tug, M. Kirsch, J. Fandrey // Cell Signal. – 2010. – Vol. 22 (3). – P. 349–356.

189. p53 cannot be induced by hypoxia alone but responds to the hypoxic microenvironment / Y. Pan, P.R. Oprysko, A.M. Asham [et al.] // Oncogene. – 2004. – Vol. 23 (29). – P. 4975–4983.

190. Pathophysiology of mitochondrial lipid oxidation: Role of 4-hydroxynonenal (4-HNE) and other bioactive lipids in mitochondria / M. Xiao, H. Zhong, L. Xia [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2017. – Vol. 111. – P. 316–327.

191. Pillay, C.S. Computational models as catalysts for investigating redoxin systems / C.S. Pillay, J.M. Rohwer // Essays Biochem. – 2024. – Vol. 68(1). – P. 27–39.

192. 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.

193. Poole, L.B. Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation / L.B. Poole, K.J. Nelson // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2008. – Vol. 12 (1). – P. 18–24.

194. Poole, L.B. Protein sulfenic acids in redox signaling / L.B. Poole, P.A. Karplus, A. Claiborne // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2004. – Vol. 44. – P. 325–347.

195. Poole, L.B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry / L.B. Poole // Free Radic. Biol. Med. – 2015. – Vol. 80. – P. 148–157.

196. Pouyssegur, J. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression / J. Pouyssegur, F. Dayan, N.M. Mazure // Nature. – 2006. – Vol. 441 (7092). – P. 437–443.

197. Prodeath or prosurvival: Two facets of hypoxia inducible factor-1 in perinatal brain injury / W. Chen, R.P. Ostrowski, A. Obenaus, J.H. Zhang // Exp. Neurol. – 2009. – Vol. 216 (1). – P. 7–15.

198. Protein post-translational modifications in the regulation of cancer hallmarks / H. Wang, L. Yang, M. Liu, J. Luo // Cancer Gene Ther. – 2023. – Vol. 30 (4). – P. 529–547.

199. Proteome-wide analysis of cysteine oxidation reveals metabolic sensitivity to redox stress / J. Van der Reest, S. Lilla, L. Zheng [et al.] // Nat. Commun. – 2018. – Vol. 9. – P. 1581.

200. Putker, M. Intermolecular disulfide-dependent redox signalling / M. Putker, H.R. Vos, T.B. Dansen // Biochem. Soc. Trans. – 2014. – Vol. 42 (4). – P. 971–978.

201. Raha, S. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing / S. Raha, B.H. Robinson // Trends Biochem. Sci. – 2000. – Vol. 25 (10). – P. 502–508.

202. Rahman, I. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method / I. Rahman, A. Kode, S.K. Biswas // Nat. Protoc. – 2006. – Vol. 1 (6). – P. 3159–3165.

203. Rasola, A. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis / A. Rasola, P. Bernardi // Cell Calcium. – 2011. – Vol. 50 (3). – P. 222–233.

204. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O_2 sensing / N.S. Chandel, D.S. McClintock, C.E. Feliciano [et al.] // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275 (33). – P. 25130–25138.

205. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease / M. Valko, K. Jomova, C.J. Rhodes [et al.] // Arch. Toxicol. – 2016. – Vol. 90 (1). – P. 1–37.

206. Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: Crucial players in cancer growth and therapy / B. Marengo, M. Nitti, A.L. Furfaro [et al.] // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2016. – Vol. 2016. – P. 6235641.

207. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate / A. Salmeen, J.N. Andersen, M.P. Myers [et al.] // Nature. – 2003. – Vol. 423 (6941). – P. 769–773.

208. 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.

209. Redza-Dutordoir, M. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species / M. Redza-Dutordoir, D.A. Averill-Bates // Biochim. Biophys. Acta. – 2016. – Vol. 1863 (12). – P. 2977–2992.

210. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD / A.V. Budanov, A.A. Sablina, E. Feinstein [et al.] // Science. – 2004. – Vol. 304 (5670). – P. 596–600.

211. Regulation of protein function by S-nitrosation and S-glutathionylation: processes and targets in cardiovascular pathophysiology / E. Belcastro, C. Gaucher, A. Corti [et al.] // Biol. Chem. – 2017. – Vol. 398 (12). – P. 1267–1293.

212. Regulations of ABCB1 and ABCG2 expression through MAPK pathways in acute lymphoblastic leukemia cell lines / H. Tomiyasu, M. Watanabe, K. Sugita [et al.] // Anticancer Res. – 2013. – Vol. 33 (12). – P. 5317–5323.

213. Reth, M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation / M. Reth // Nat. Immunol. – 2002. – Vol. 3 (12). – P. 1129–1134.

214. Review of cancer cell resistance mechanisms to apoptosis and actual targeted therapies / M. Kulbay, A. Paimboeuf, D. Ozdemir, J. Bernier // J. Cell. Biochem. – 2022. – Vol. 123 (11). – P. 1736–1761.

215. Role of Ca^{2+} and ion channels in the regulation of apoptosis under hypoxia / M. Wang, J. Tan, Y. Miao [et al.] // Histol. Histopathol. – 2018. – Vol. 33 (3). – P. 237–246.

216. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance / N. Traverso, R. Ricciarelli, M. Nitti [et al.] // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2013. – Vol. 2013. – P. 972913.

217. Role of glutathione system redox potential in apoptosis dysregulation in MCF-7 Breast Adenocarcinoma / E.V. Shakhristova, E.A. Stepovaya, N.V. Ryazantseva [et al.] // Bull. Exp. Biol. Med. – 2016. – Vol. 160 (3). – P. 364–367.

218. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation / B. Zhang, C. Pan, C. Feng [et al.] // Redox Rep. – 2022. – Vol. 27 (1). P. 45–52.

219. Role of protein -SH groups in redox homeostasis – the erythrocyte as a model system / P. Di Simplicio, M.G. Cacace, L. Lusini [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 1998. – Vol. 355 (2). – P. 145–152.

220. Role of reduced glutathione efflux in apoptosis of immortalized human keratinocytes induced by UVA / Y.Y. He, J.L. Huang, D.C. Ramirez, C.F. Chignell // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278 (10). – P. 8058–8064.

221. ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications / N.T. Moldogazieva, I.M. Mokhosoev, N.B. Feldman, S.V. Lutsenko // Free Radic. Res. – 2018. – Vol. 52 (5). – P. 507–543.

222. ROS and the DNA damage response in cancer / U.S. Srinivas, B.W.Q. Tan, B.A. Vellayappan, A.D. Jeyasekharan // Redox Biol. – 2019. – Vol. 25. – P. 101084.

223. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells / A.V. Snezhkina, A.V. Kudryavtseva, O.L. Kardymon [et al.] // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2019. – Vol. 2019. – P. 6175804.

224. Sabapathy, K. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others / K. Sabapathy, D.P. Lane // Nat. Rev. Clin. Oncol. – 2018. – Vol. 15 (1). – P. 13–30.

225. Sabens Liedhegner, E.A. Mechanisms of altered redox regulation in neurodegenerative diseases – focus on S-glutathionylation / E.A. Sabens Liedhegner, X.H. Gao, J.J. Mieyal // Antioxid. Redox Signal. – 2012. – Vol. 16 (6). – P. 543–566.

226. 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.

227. Salvesen, G.S. Caspase mechanisms / G.S. Salvesen, S.J. Riedl // Adv. Exp. Med. Biol. – 2008. – Vol. 615. – P. 13–23.

228. Saxena, K. Acute vs. Chronic vs. Cyclic hypoxia: Their differential dynamics, molecular mechanisms, and effects on tumor progression / K. Saxena, M.K. Jolly // Biomolecules. – 2019. – Vol. 9 (8). – P. 339.

229. Schafer, F.Q. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple / F.Q. Schafer, G.R. Buettner // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – Vol. 30 (11). – P. 1191–1212.

230. Schenk, R.L. BCL-2: Long and winding path from discovery to therapeutic target / R.L. Schenk, A. Strasser, G. Dewson // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2017. – Vol. 482 (3). – P. 459–469.

231. Semenza, G.L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics / G.L. Semenza / Oncogene. – 2010. – Vol. 29 (5). – P. 625–634.

232. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype / G.L. Semenza // EMBO J. – 2017. – Vol. 36 (3). – P. 252–259.

233. Sies H. Role of metabolic H_2O_2 generation: redox signaling and oxidative stress / H. Sies // J. Biol. Chem. – 2014. – Vol. 289 (13). – P. 8735–8741.

234. Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress / H. Sies // Redox Biol. – 2017. – Vol. 11. – P. 613–619.

235. Sies, H. Oxidative stress / H. Sies, C. Berndt, D.P. Jones // Annu. Rev. Biochem. – 2017. – Vol. 86. – P. 715–748.

236. Souers From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors / A. Ashkenazi, W.J. Fairbrother, J.D. Leverson, A.J. Souers // Nat. Rev. Drug Discov. – 2017. – Vol. 16 (4). – P. 273–284.

237. Srinivas Bharath, M.M. Post-translational oxidative modifications of mitochondrial complex I (NADH: Ubiquinone Oxidoreductase): Implications for pathogenesis and therapeutics in human diseases / M.M. Srinivas Bharath // J. Alzheimers Dis. – 2017. – Vol. 60 (s1). – P. S69–S86.

238. Steinbrenner, H. Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond / H. Steinbrenner, B. Speckmann, L.O. Klotz // Arch. Biochem. Biophys. – 2016. – Vol. 595. – P. 113–119.

239. Stone, J.R. An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems / J.R. Stone // Arch. Biochem. Biophys. – 2004. – Vol. 422 (2). – P. 119–124.

240. Subarsky, P. Graded hypoxia modulates the invasive potential of HT1080 fibrosarcoma and MDA MB231 carcinoma cells / P. Subarsky, R.P. Hill // Clin. Exp. Metastasis. – 2008. – Vol. 25 (3). – P. 253–264.

241. Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling / Y. Wang, R. Branicky, A. Noë, S. Hekimi // J. Cell Biol. – 2018. – Vol. 217 (6). – P. 1915–1928.

242. Synthesis of 4-substituted 3-[3-(dialkylaminomethyl)indol-1-yl]maleimides and study of their ability to inhibit protein kinase C-a, prevent development of multiple drug resistance of tumor cells and cytotoxicity / A.Y. Simonov, S.A. Lakatosh, Y.N. Luzikov [et al.] // Russ. Chem. Bull. – 2008. – Vol. 57. – P. 2011–2020.

243. Targeting calcium signaling in cancer therapy / C. Cui, R. Merritt, L. Fu, Z. Pan // Acta Pharm. Sin. B. – 2017. – Vol. 7 (1). – P. 3–17.

244. Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research / X. Tong, R. Tang, M. Xiao [et al.] // J. Hematol. Oncol. – 2022. – Vol. 15 (1). – P. 174.

245. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy / V.J.N. Bykov, S.E. Eriksson, J. Bianchi, K.G. Wiman // Nat. Rev. Cancer. – 2018. – Vol. 18 (2). – P. 89–102.

246. Taylor, R.C. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level / R.C. Taylor, S.P. Cullen, S.J. Martin // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2008. – Vol. 9 (3). – P. 231–241.

247. The BCL-2 family reunion / J.E. Chipuk, T. Moldoveanu, F. Llambi [et al.] // Mol. Cell. – 2010. – Vol. 37 (3). – P. 299–310.

248. The down-regulation of SLC7A11 enhances ROS induced P-gp over-expression and drug resistance in MCF-7 breast cancer cells / C. Ge, B. Cao, D. Feng [et al.] // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7 (1). – P. 3791.

249. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate / A. Hafner, M.L. Bulyk, A. Jambhekar, G. Lahav // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2019. – Vol. 20 (4). – P. 199–210.

250. The relationship of intracellular iron chelation to the inhibition and regeneration of human ribonucleotide reductase / C.E. Cooper, G.R. Lynagh, K.P. Hoyes [et al.] // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271 (34). – P. 20291–20299.

251. The role of heat shock proteins in metastatic colorectal cancer: A review / H. Javid, P. Hashemian, S. Yazdani [et al.] // J. Cell. Biochem. – 2022. – Vol. 123 (11). – P. 1704–1735.

252. The role of the glutathione system in oxidative modification of proteins and dysregulation of apoptosis in Jurkat tumor cells / O.L. Nosareva, E.A. Stepovaya, E.V. Shakhristova [et al.] // Bull. Exp. Biol. Med. – 2017. – Vol. 164 (2). – P. 199–202.

253. Thom, S.R. Oxygen-dependent antagonism of lipid perodixation / S.R. Thom, M.E. Elbuken // Free Radic. Biol. Med. – 1991. – Vol. 10 (6). – P. 413–426.

254. Tokarz, P. Role of mitochondria in carcinogenesis / P. Tokarz, J. Blasiak // Acta Biochim. Pol. – 2014. – Vol. 61 (4). – P. 671–678.

255. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain / J. St-Pierre, J.A. Buckingham, S.J. Roebuck, M.D. Brand // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277 (47). – P. 44784–44790.

256. Tsujimoto, Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? / Y. Tsujimoto // Genes Cells. – 1998. – Vol. 3 (11). – P. 697–707.

257. Turpaev, K.T. Reactive oxygen species and regulation of gene expression / K.T. Turpaev // Biochemistry (Mosc). – 2002. – Vol. 67 (3). – P. 281–292.

258. Up-down regulation of HIF-1α in cancer progression / M. Rashid, L.R. Zadeh, B. Baradaran [et al.] // Gene. – 2021. – Vol. 798. – P. 145796.

259. Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca^{2+} in platelets and neutrophils. Loading cells with the dye, calibration of traces, measurements in the presence of plasma, and buffering of cytosolic Ca^{2+} / J.E. Merritt, S.A. McCarthy, M.P. Davies, K.E. Moores // J. Biochem. – 1990. – Vol. 269 (2). – P. 513–519.

260. Using MTT viability assay to test the cytotoxicity of antibiotics and steroid to cultured porcine corneal endothelial cells / H.Z. Wang, C.H. Chang, C.P. Lin, M.C. Tsai // J. Ocul. Pharmacol. Ther. – 1996. – Vol. 12 (1). – P. 35–43.

261. Van Opdenbosch, N. Caspases in cell death, inflammation, and disease / N. Van Opdenbosch, M. Lamkanfi // Immunity. – 2019. – Vol. 50 (6). – P. 1352–1364.

262. Various aspects of calcium signaling in the regulation of apoptosis, autophagy, cell proliferation, and cancer / S. Patergnani, A. Danese, E. Bouhamida [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21 (21). – P. 8323.

263. Vaupel, P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression / P. Vaupel // Oncologist. – 2004. – Vol. 9, Suppl. 5. – P.10–17.

264. Veal, E.A. Hydrogen peroxide sensing and signaling / E.A. Veal, A.M. Day, B.A. Morgan // Mol. Cell. – 2007. – Vol. 26 (1). – P. 1–14.

265. Wang, X. p53: Protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis / X. Wang, E.R. Simpson, K.A. Brown // Cancer Res. – 2015. – Vol. 75 (23). – P. 5001–5007.

266. Wang, Y. Metabolic features of cancer cells / Y. Wang, Y. Xia, Z. Lu // Cancer Commun. (Lond). – 2018. – Vol. 38 (1). – P. 65.

267. Webb, J.D. Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing / J.D. Webb, M.L. Coleman, C.W. Pugh // Cell. Mol. Life Sci. – 2009. – Vol. 66 (22). – P. 3539–3554.

268. Welsh, C.L. Protein tyrosine phosphatase regulation by reactive oxygen species / C.L. Welsh, L.K. Madan // Adv. Cancer. Res. – 2024. – Vol. 162. – P. 45–74.

269. Wong, W.W. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway / W.W. Wong, H. Puthalakath // IUBMB Life. – 2008. – Vol. 60 (6). – P. 390–397.

270. Wood, Z.A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling / Z.A. Wood, L.B. Poole, P.A. Karplus // Science. – 2003. – Vol. 300 (5619). – P. 650–653.

271. 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.

272. Wouters, B.G. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer / B.G. Wouters, M. Koritzinsky // Nat. Rev. Cancer. – 2008. – Vol. 8 (11). – P. 851–864.

273. Xie, H. Oxygen availability and metabolic reprogramming in cancer / H. Xie, M.C. Simon // J. Biol. Chem. – 2017. – Vol. 292 (41). – P. 16825–16832.

274. Yakusheva, E.N. Structure and function of multidrug resistance protein 1 / E.N. Yakusheva, D.S. Titov // Biochemistry (Mosc). – 2018. – Vol. 83 (8). – P. 907–929.

275. Yip, K.W. Bcl-2 family proteins and cancer / K.W. Yip, J.C. Reed // Oncogene. – 2008. – Vol. 27 (50). – P. 6398–6406.

276. Zhao, S. Identification of Smurf2 as a HIF-1α degrading E3 ubiquitin ligase / S. Zhao, W.S. El-Deiry // Oncotarget. – 2021. – Vol. 12 (20). – P. 1970–1979.

277. Zhu, Y. Altered glutathione homeostasis in animals prenatally exposed to lipopolysaccharide / Y. Zhu, P.M. Carvey, Z. Ling // Neurochem. Int. – 2007. – Vol. 50 (4). – P. 671–680.