

На правах рукописи

ОРЛОВ
Дмитрий Сергеевич

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

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

ТОМСК – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Носарева Ольга Леонидовна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, доцент, директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, профессор кафедры фундаментальной медицины образовательно-научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»

Литвинова Лариса Сергеевна

доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой биологии медицинской Орден Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» (ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»)

Агеева Елизавета Сергеевна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН)

Защита диссертации состоится «__»_____ 2025 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 21.2.068.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте www.ssmu.ru

Автореферат разослан «__»_____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Ласукова Татьяна Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Опухолевый рост является одной из центральных проблем патологии в силу неуклонной тенденции к росту числа онкологических заболеваний в России [Каприн А.Д. и соавт., 2021]. Молекулярные механизмы развития этого патологического процесса включают нарушение пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток на фоне окислительно-восстановительного дисбаланса [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2017; Gundamaraju R. et al., 2018; Moldogazieva N.T. et al., 2018; Zhang B. et al., 2022; Ren Y. et al., 2023; Tuli H.S. et al., 2023]. 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 [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2017; Labrousse-Arias D. et al., 2017; Nosareva O.L. et al., 2017; Helfinger V., Schröder K., 2018; Chatterjee R., Chatterjee J., 2020; Черненко И.Н. и соавт., 2022]. Активные формы кислорода участвуют в функционировании редокс-системы клеток и способствуют окислительной модификации макромолекул [Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В., 2008; Moldogazieva N.T. et al., 2018; Yang M.L. et al., 2018; Mu B. et al., 2024]. 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 [Нельсон Д., Кокс М., 2014; Deng P., Haynes C.M., 2017; Herst P.M. et al., 2017].

Существенный вклад в поддержании баланса между прооксидантами и антиоксидантами клетки вносит система глутатиона [Boysen G., 2017; Рыбакова Л.П. соавт., 2022]. 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 [Lu J., Holmgren A., 2014; Poimenova I.A. et al., 2024]. 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 [Никитина О.А. и соавт., 2022]. 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 [Belcastro E. et al., 2017; Dominko K., Đikić D., 2018; Kalinina E.V., Novichkova M.D., 2023]. Так, посредством глутатионилирования реализуется участие глутатиона в изменении экспрессии редокс-чувствительных генов, регуляции внутриклеточной сигнализации, функции ион-транспортирующих систем [Baba S.P., Bhatnagar A., 2018; Moldogazieva N.T. et al., 2018; Welsh C.L., Madan L.K., 2024].

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 [Lu J., Holmgren A., 2012]. Редокс-баланс клетки напрямую зависит от состояния системы глутатиона, ведущим компонентом которой является восстановленный глутатион [He L. et al., 2017; Poimenova I.A. et al., 2024]. Этот трипептид выступает важнейшим акцептором гидроксильного радикала, обладающего мощным цитотоксическим эффектом [Asantewaa G., Harris I.S., 2021; Рыбакова Л.П. соавт., 2022]. 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 [Chen Y. et al., 2016; Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A., 2016; Zhang B. et al., 2022]. 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 [Носарева О.Л. и соавт., 2015; Shakhristova E.V. et al., 2016; Nosareva O.L. et al., 2017; Miller C.G. et al., 2018; Moldogazieva N.T. et al., 2018; Dilek O., 2022; Wang H. et al., 2023]. 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 [Дубинина Е.Е., 2006; Носарева О.Л. и соавт., 2015; Nosareva O.L. et al., 2017; Aryal B., Rao V.A., 2018; Musaogullari A., Chai Y.C., 2020; Niu B. et al., 2021]. 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-дителиозитритол) SH-групп и предшественника синтеза глутатиона (N-ацетилцистеин) в клетках линии P19 (тератокарциномы мыши СЗН/Не) при нормоксии и гипоксии.

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

3. Охарактеризовать влияние редокс-модуляторов (блокатора (N-этилмалиемид), протектора (1,4-дителиозитритол) 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 СЗН/Не) при нормоксии и гипоксии.

4. Установить молекулярные механизмы редокс-управления апоптозом клеток линии P19 (тератокарциномы мыши СЗН/Не) 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 P19 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 P19 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 P19, 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 P19 (тератокарцинома мышцы СЗН/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-дитиозеритритола 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 мышцы СЗН/Не) 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 мышцы СЗН/Не) 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 мышцы СЗН/Не).

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, посвященной 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.

Структура и объем диссертации. 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, определены цель, основные задачи исследования, научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен анализ современной научной литературы по теме диссертационного исследования, описаны современные представления о роли редокс-баланса и окислительной модификации белков в нарушении регуляции апоптоза опухолевых клеток в условиях гипоксии. Рассмотрены молекулярные механизмы реализации апоптоза, редокс-регуляции и особенности метаболизма опухолевых клеток при гипоксии. Охарактеризована окислительная модификация белков (глутатионилирование и карбонилирование) с позиции молекулярного механизма селективного управления активностью белков в норме и при опухолевом росте.

Во второй главе диссертации описаны объект, материал и методы исследования. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 3258 от 25.02.2013 г.).

Материалом для исследования служили опухолевые клетки линии P19 (тератокарцинома мышцы СЗН/Не), полученные из Российской коллекции клеточных культур ФГБУН Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, Россия).

Опухолевые клетки линии P19 культивировали в полной питательной среде α -MEM («БиолоТ», Россия), содержащей 10 % инактивированной при 56 °C в течение 30 минут эмбриональной телячьей сыворотки («БиолоТ», Россия), L-глутамин (0,3 мг/мл) («БиолоТ», Россия) и гентамицин (0,1 мг/мл) («Микроген», Россия) в CO₂-инкубаторе «МСО-5АС» («Sanyo», Япония) при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Культивирование проводили с интервалом 2 дня и при достижении субконфлюэнтного слоя рассаживали клетки. В опыте использовались культуры клеток, содержащие не более 5 % погибших клеток. Жизнеспособность клеток оценивали микроскопическим методом с помощью 0,4 % раствора трипанового синего («Serva», США).

Для достижения поставленной цели опухолевые клетки линии P19 культивировали при нормоксии и гипоксии в условиях модуляции редокс-статуса с помощью либо блокатора SH-групп пептидов и белков N-этилмалеимида (NEM) («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 5 mM [Sahaf B., 2003], либо протектора тиоловых групп пептидов и белков 1,4-дитиоэритритола (DTE) («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 5 mM [Brunelli L. et al., 1995], либо предшественника синтеза глутатиона N-ацетилцистеина (NAC) («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 5 mM [Laragione T. et al., 2003]. Культуру инкубировали в условиях нормоксии или гипоксии в течение 18 часов при температуре 37 °C без с добавлением одного из исследуемых веществ (NEM или NAC, или DTE). Клеточная культура в день эксперимента не превышала 80 % от достижения конфлюэнтного слоя. Для моделирования гипоксии использовали инкубационную камеру «Hypoxia Incubator Chamber» («STEMCELL», Канада). Для удаления кислорода, находящегося внутри камеры, через неё пропускали газовую смесь (5 % O₂, 90 % N₂, 5 % CO₂) 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 с помощью оксиметра «Dissolved Oxygen Meter» («HANNA HI 9146», Италия).

После завершения периода инкубации оценивали продукцию активных форм кислорода (АФК), окислительную модификацию белков, состояние системы глутатиона, внутриклеточное содержание ионов Ca²⁺ 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».

Количественную оценку клеток, вступивших в апоптоз, проводили с использованием набора Annexin V-FITC («eBioscience», США); Fas- и TNF RI-положительных – с использованием моноклональных антител к Fas (апоптозный антиген 1) или TNF RI (tumor necrosis factor receptor I type, рецептор фактора некроза опухоли I типа) («R&D Systems», США); со сниженным митохондриальным потенциалом – с использованием флуорохрома 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазол-карбоцианин йодида (JC-1), входящего в состав набора Flow Cytometry Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit («BD Biosciences», США); внутриклеточного содержания АФК – с помощью красителя с заблокированной флуоресценцией – 2,7-дихлорфлуоресцеина диацетата («Sigma-Aldrich», США) [Halliwell B., Whiteman M.,

2004]; содержания ионов Ca^{2+} в цитоплазме по интенсивности флуоресценции липофильного зонда Fluo 3 AM («Sigma-Aldrich», США), проникающего в клетку и связывающего ионы Ca^{2+} [Merritt J.E. et al., 1990] на проточном цитометре FACS Canto™ II («BD», США) с применением программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3.

Спектрофотометрическим методом оценивали жизнеспособность опухолевых клеток линии P19 с использованием солей тетразолия (3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (MTT)) по способности восстановления желтого MTT ферментами митохондрий метаболически активных клеток (преимущественно сукцинатдегидрогеназой) до нерастворимых в воде темно-фиолетовых кристаллов формазана [Wang H.Z. et al., 1996]; внутриклеточную продукцию гидроксильного радикала по способности клетками разрушать модельный субстрат – 2-дезоксид-рибозу («Sigma-Aldrich», США), после их опсонизации раствором зимозана («Sigma-Aldrich», США) [Thom S.R., Elbuen M.E., 1991]; содержание общего, восстановленного (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) – методом ферментативной рециркуляции и блокирования SH-групп GSH винилпиридином («Wako», Япония) [Rahman I. et al., 2006] (дополнительно рассчитывали величину соотношения GSH/GSSG как показатель редокс-статуса клетки); концентрацию SH-групп белков – по их способности взаимодействовать с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой (ДТНБ) («Sigma-Aldrich», США) и образовывать окрашенное соединение тио-2-нитробензойную кислоту (ТНБ), водный раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм, а уровень белково-связанного глутатиона – после предварительного его высвобождения 1 % NaBH_4 («Sigma-Aldrich», США) из связи с белками [Burchill B.R. et al., 1978]; активность глутатионредуктазы – по ее способности восстанавливать GSSG до 2 молекул GSH в присутствии восстановленного никотинамидадениндинуклеотид фосфата (НАДФН) («Sigma-Aldrich», США) и дальнейшем взаимодействии GSH и ДТНБ с образованием ТНБ [Worthington D.J., Rosemeyer M.A., 1976]; активность глутатионпероксидазы – по способности фермента катализировать реакцию взаимодействия GSH с гидропероксидом трет-бутила [Карпищенко А.И., 1998]; содержание карбонильных производных белков – по реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов [Арутюнян А.В. и соавт., 2000]; концентрацию общего белка – методом по взаимодействию красителя Кумасси голубого G-250 («Sigma-Aldrich», США) с остатками аргинина и лизина белковых молекул и образованию комплекса, который имел максимум поглощения при длине волны 595 нм [Bradford M.M., 1976]. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре «СФ-2000» («ОКБ-Спектр», Россия).

Статистическая обработка полученных данных выполнялась в программе SPSS Statistics (версия 17.0). Нормальность распределения признаков проверяли с помощью 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 Крускал-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. Результаты статистической обработки считали значимыми при уровне $p < 0,05$ [Гланц С., 1999].

В третьей главе диссертации представлены результаты исследования регуляции и реализации апоптоза, изменения состояния системы глутатиона и окислительной

модификации белков в опухолевых клетках линии P19 как в условиях нормоксии и гипоксии, так и при применении редокс-модуляторов NEM или NAC, или DTE. Проанализированы основные параметры рецепторного и митохондриального пути апоптотической гибели опухолевых клеток линии P19, особенностей изменения состояния системы глутатиона, концентрации ионов Ca^{2+} и окислительной модификации белков в условиях редокс-модуляции гомеостаза этих клеток при нормальном и сниженном напряжении кислорода. Глава иллюстрирована таблицами.

В четвертой главе проведен анализ и обсуждение полученных оригинальных данных с привлечением сведений по изучаемой теме, представленных в современной научной литературе.

Современная концепция устойчивости опухолевых клеток к программированной гибели базируется на их способности успешно существовать в условиях окислительного стресса (ОС) и низкого напряжения кислорода в клетке. Используемая модель гипоксии в нашей работе позволяла создать условия повышенной продукции АФК в опухолевых клетках линии P19.

В проведенном нами исследовании было установлено статистически значимое возрастание числа аннексин-положительных клеток на 305,66 % ($p < 0,05$), содержания АФК – 84,61 % ($p < 0,05$) и гидроксильного радикала – 643,44 % ($p < 0,05$) на фоне сопоставимого количества TNF RI- и Fas-положительных опухолевых клеток линии P19, инкубированных в условиях гипоксии, по сравнению с результатами, полученными при нормоксии (Рисунок 1, 2, 3).

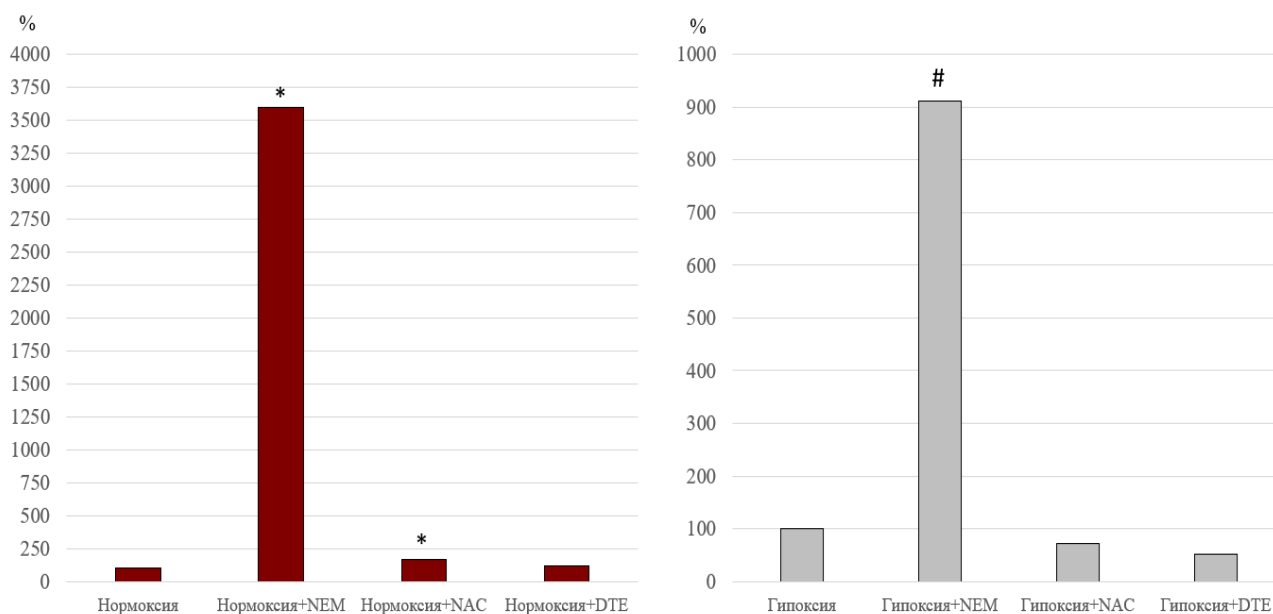


Рисунок 1 – Количество аннексин-положительных (в %) опухолевых клеток линии P19 в различных условиях культивирования при нормоксии и гипоксии.

*Примечание – Здесь и на рисунках 2-7: * – уровень статистической значимости различий по сравнению с опухолевыми клетками, культивированными в условиях нормоксии ($p < 0,05$); # – уровень статистической значимости различий по сравнению с опухолевыми клетками, культивированными в условиях гипоксии ($p < 0,05$); NEM – N-этилmaleимид, NAC – N-ацетилцистеин, DTE – 1,4-дитиоэритритол*

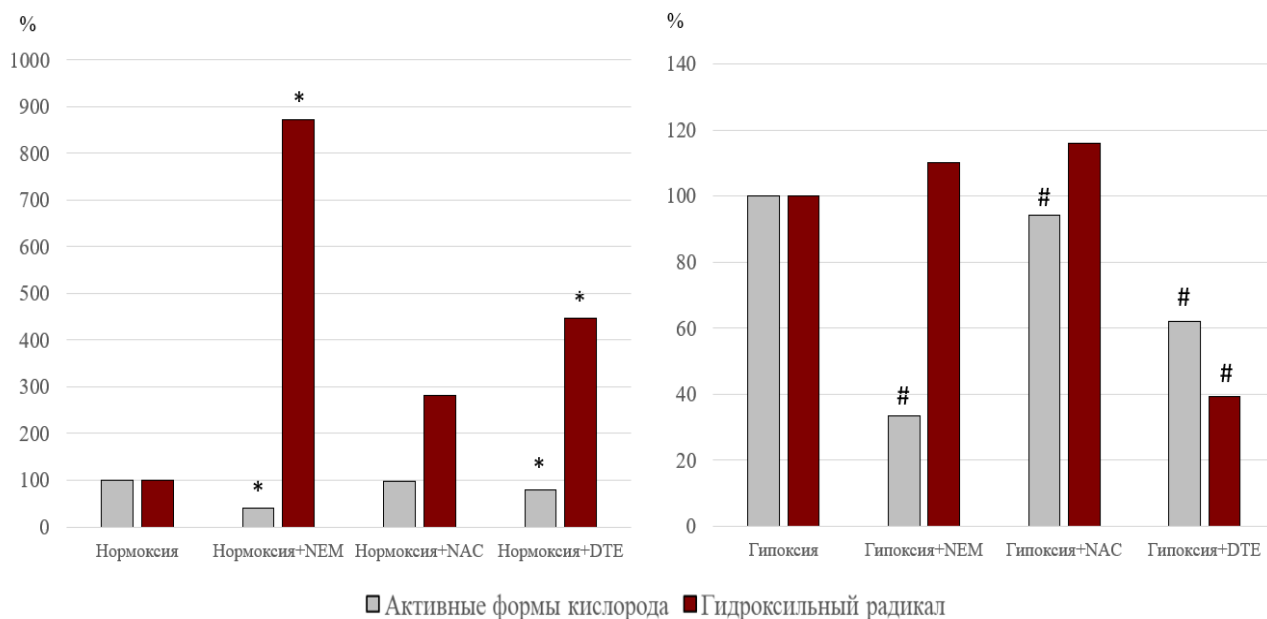


Рисунок 2 – Содержание активных форм кислорода и гидроксильного радикала (в %) в опухолевых клетках линии P19 в различных условиях культивирования при нормоксии и гипоксии

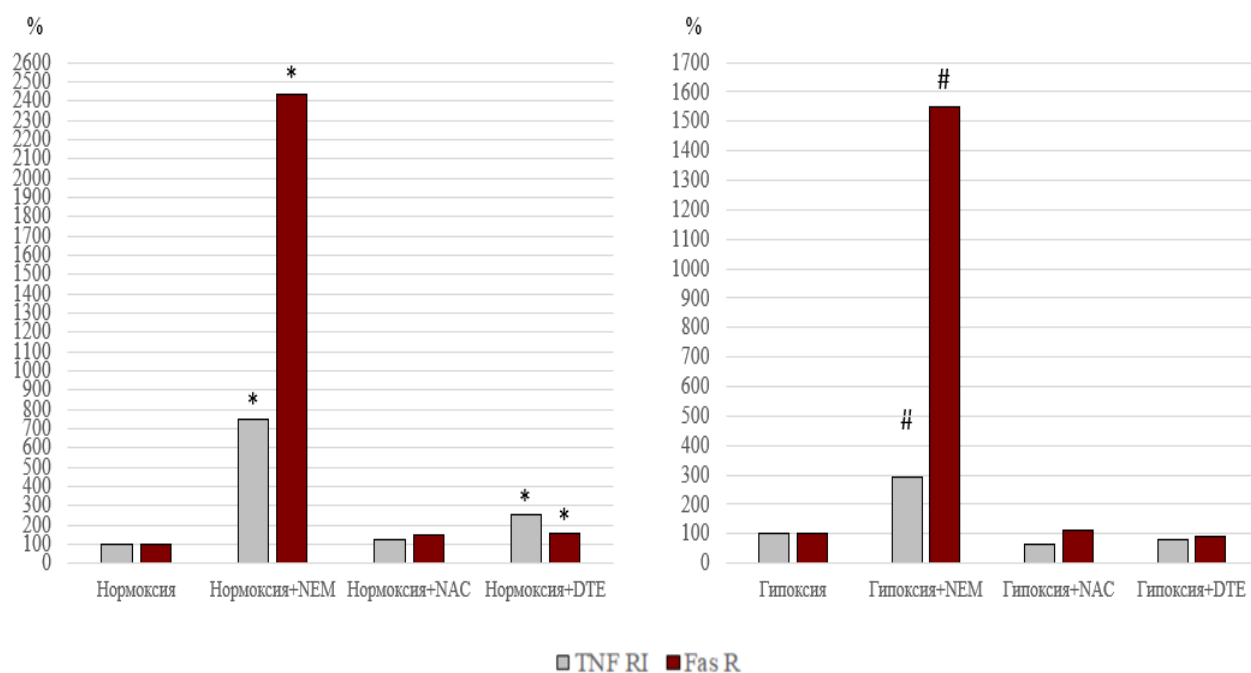


Рисунок 3 – Количество TNF RI- и Fas-положительных (в %) опухолевых клеток линии P19 в различных условиях культивирования при нормоксии и гипоксии

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 на 205,88 % ($p < 0,05$) и содержания внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} на 30,61 % ($p < 0,05$) относительно результатов, полученных при нормоксии (Рисунок 4). Также в условиях гипоксии был зафиксирован расход компонентов системы глутатиона (статистически значимое уменьшение концентрации общего глутатиона за

счет восстановленной формы тиола на 21,02 % ($p<0,05$) и свободных SH-групп белков на 54,45 % ($p<0,05$), что приводило к снижению величины соотношения GSH/GSSG на 44,74 % ($p<0,05$) в опухолевых клетках линии P19 (Рисунок 5). 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 на 70,31 % ($p<0,05$), а активность глутатионпероксидазы статистически значимо понижалась на 24,63 % ($p<0,05$) относительно результатов, полученных при нормоксии в опухолевых клетках линии P19 (Рисунок 6).

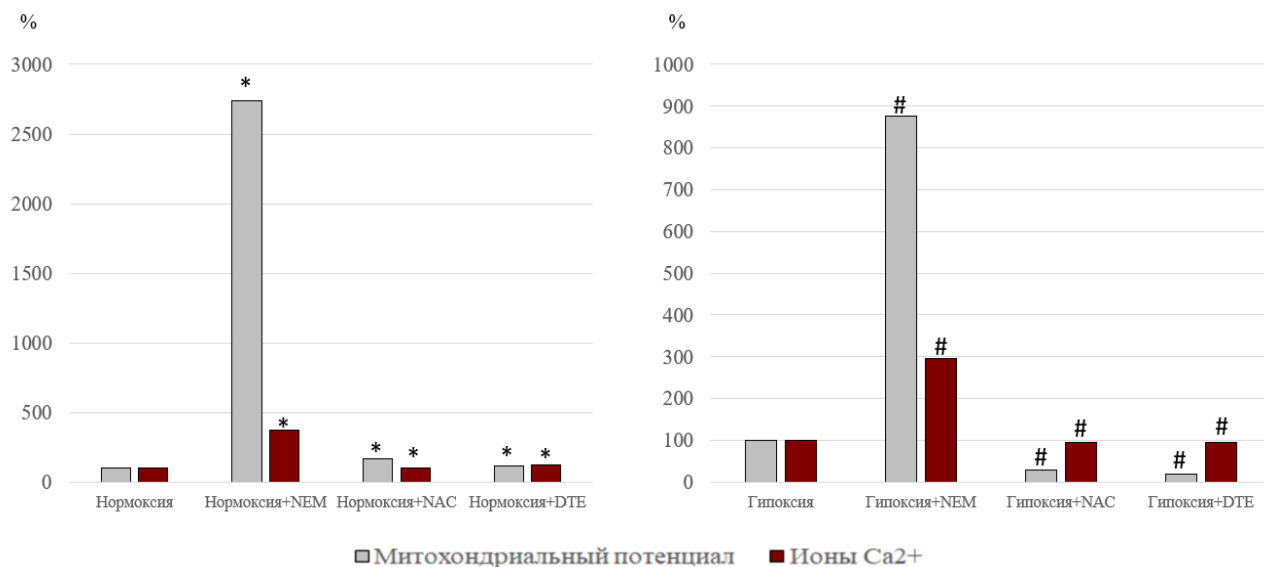


Рисунок 4 – Содержание ионов кальция и количество опухолевых клеток линии P19 со сниженным митохондриальным потенциалом (в %) в различных условиях культивирования при нормоксии и гипоксии

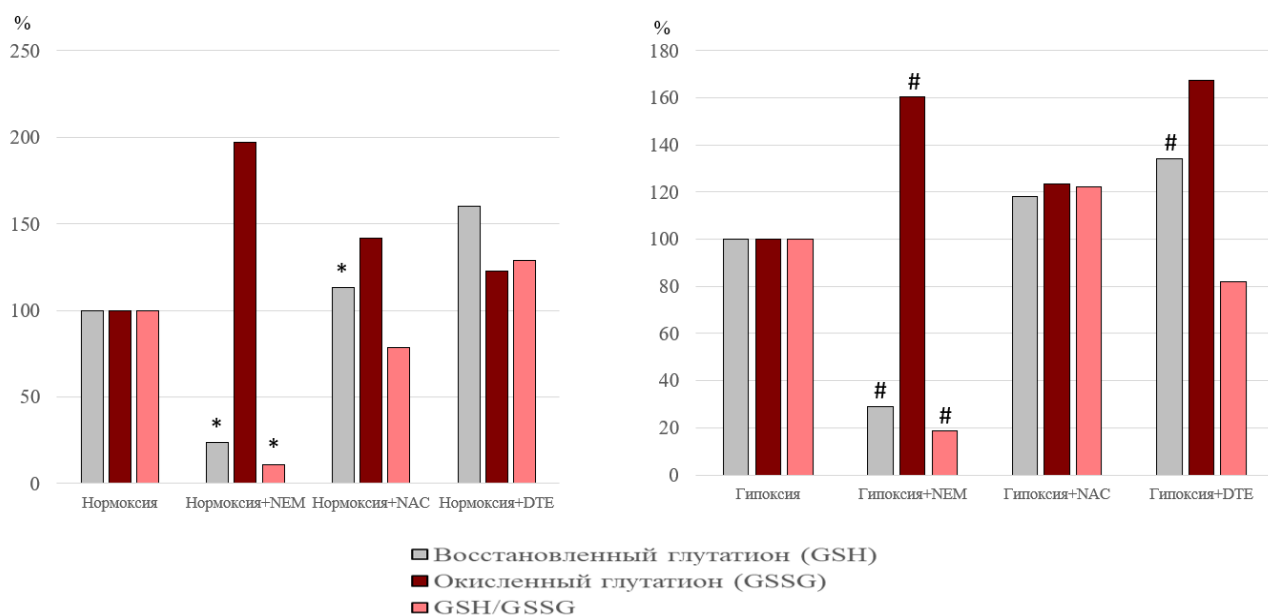


Рисунок 5 – Содержание восстановленного, окисленного глутатиона и величина их соотношения (в %) в опухолевых клетках линии P19 в различных условиях культивирования при нормоксии и гипоксии

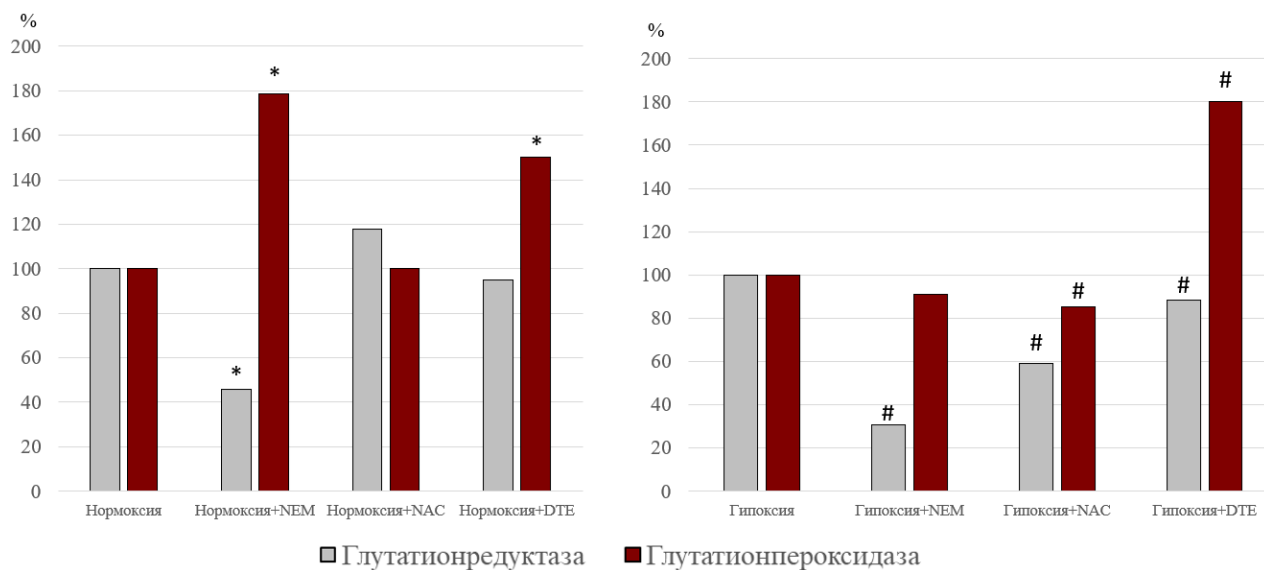


Рисунок 6 – Активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы (в %) в опухолевых клетках линии P19 в различных условиях культивирования при нормоксии и гипоксии

Вероятнее всего установленная особенность работы глутатионпероксидазы обусловлена чувствительностью к продуктам ОС в условиях гипоксии, которые могли вызывать окислительную модификацию структуры белка. Важно отметить, что при инкубировании опухолевых клеток линии P19 в условиях гипоксии происходила активация окислительной модификации белков, что выражалось в статистически значимом увеличении содержания белково-связанного глутатиона на 246,67 % ($p < 0,05$) и карбонильных производных белков на 117,31 % ($p < 0,05$) по сравнению с результатами, полученными при нормоксии (Рисунок 7). 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 концентрацией белково-связанного глутатиона ($r = -0,867$; $p < 0,05$). Наряду с этим, 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.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод об активации апоптотической гибели опухолевых клеток линии P19 в условиях гипоксии преимущественно по митохондриальному пути, сопряженному с накоплением окислительно-модифицированных белков.

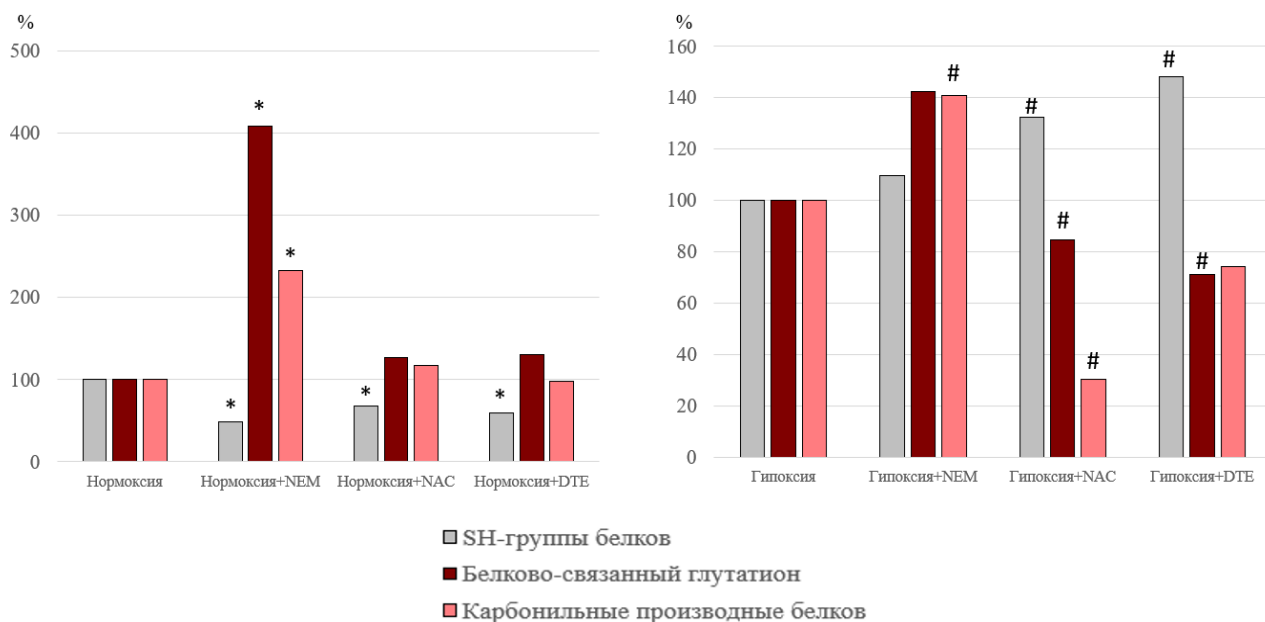


Рисунок 7 – Содержание SH-групп белков, белково-связанного глутатиона и карбонильных производных белков (в %) в опухолевых клетках линии P19 в различных условиях культивирования при нормоксии и гипоксии

Воздействие NEM в условиях нормоксии на опухолевые клетки линии P19 сопровождалось статистически значимым уменьшением продукции АФК (H_2O_2) на 59,73 % ($p < 0,05$) и увеличением содержания гидроксильного радикала – 772,95 % ($p < 0,05$) на фоне снижения величины соотношения GSH/GSSG на 88,94 % ($p < 0,05$) относительно данных, полученных при нормоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Рисунок 2, 5). Вероятнее всего, такое соотношение АФК обосновано преимущественным связыванием пероксида водорода со свободными SH-группами белков и восстановленной формой глутатиона, концентрации которых при воздействии NEM статистически значимо снижались на 51,69 % и 76,50 % ($p < 0,05$), соответственно, относительно показателя при нормоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Рисунок 5, 7). 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 на 78,36 % ($p < 0,05$) в опухолевых клетках линии P19 при дополнительном добавлении в среду инкубации NEM в условиях нормального напряжения кислорода обеспечивало прирост GSSG и способствовало обратимой окислительной модификации белков – глутатионилированию, о чем свидетельствовало увеличение содержания белково-связанного глутатиона на 308,33 % ($p < 0,05$) относительно значений при нормоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Рисунок 7). Помимо этого, нами было установлено статистически значимое увеличение карбонильных производных белков на 132,48 % ($p < 0,05$) в опухолевых клетках линии P19 при воздействии NEM в условиях нормоксии относительно показателя, зафиксированного при нормальном напряжении кислорода без воздействия указанного редокс-модулятора (Рисунок 7). 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 NEM, что выражалось в статистически значимом увеличении числа аннексин-, Fas-, TNF RI-

положительных и опухолевых клеток линии P19 со сниженным митохондриальным потенциалом на 3498,11 %, 2333,33 %, 650,00 %, 2638,24 % ($p < 0,05$), соответственно, на фоне значимого увеличения внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+} на 270,41 % ($p < 0,05$) относительно показателей, полученных при нормоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Рисунок 3, 4). Проведенный корреляционный анализ установил статистически значимую сильную отрицательную взаимосвязь между содержанием GSSG и концентрацией карбонильных производных белков ($r = -0,872$; $p < 0,05$) в опухолевых клетках линии P19 при добавлении NEM в условиях нормоксии.

Воздействие DTE в условиях нормоксии на опухолевые клетки линии P19 сопровождалось статистически значимым снижением продукции АФК (H_2O_2) на 20,14 % ($p < 0,05$) и увеличением содержания гидроксильного радикала на 346,17 % ($p < 0,05$) относительно результатов, полученных при нормоксии без воздействия указанного редокс-модулятора (Рисунок 2). Содержание общего глутатиона в опухолевых клетках линии P19 при нормальном напряжении кислорода и добавлении в среду инкубации DTE статистически значимо возрастало за счет GSH на 60,25 % ($p < 0,05$), что способствовало повышению активности глутатионпероксидазы на 50,00 % ($p < 0,05$) относительно показателей, полученных при нормоксии без воздействия DTE (Рисунок 5, 6). Следует отметить, что при воздействии DTE в условиях нормоксии статистически значимо увеличивалось количество клеток, несущих на своей поверхности TNF RI и Fas-рецепторы на 150,00 % и 55,56 % ($p < 0,05$), соответственно, а также число клеток со сниженным митохондриальным потенциалом на 17,65 % ($p < 0,05$) на фоне увеличения внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+} на 25,26 % ($p < 0,05$) и снижения концентрации свободных SH-групп белков на 40,46 % ($p < 0,05$) относительно данных, полученных в клетках инкубированных при нормальном напряжении кислорода и без воздействия указанного редокс-модулятора (Рисунок 3, 4, 7). 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 (Рисунок 1). 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 при нормоксии нами было получено статистически значимое снижение содержания свободных SH-групп белков на 31,57 % ($p < 0,05$), сопровождающееся увеличением числа аннексин- и Fas-положительных клеток, клеток со сниженным митохондриальным потенциалом и возрастанием внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} на 69,81 %, 44,44 %, 70,59 % и 2,42 % ($p < 0,05$), соответственно, по сравнению с показателями, полученными в клетках при нормоксии без добавления в среду инкубации указанного редокс-модулятора (Рисунок 1, 3, 4, 7).

В условиях гипоксии дополнительное добавление NEM в среду инкубации опухолевых клеток линии P19 сопровождалось статистически значимым снижением величины соотношения GSH/GSSG на 81,45 % ($p < 0,05$) и содержания общего глутатиона (за счет GSH на 70,91 % ($p < 0,05$)), однако концентрация GSSG была выше на 60,47 % ($p < 0,05$) относительно соответствующих значений, полученных в клетках, инкубированных при гипоксии без воздействия NEM (Рисунок 5). Причиной статистически значимого возрастания концентрации GSSG в опухолевых клетках линии

P19 при изучаемом воздействии вероятнее всего была сниженная активность глутатионредуктазы на 69,41 % ($p < 0,05$) относительно показателя, полученного в клетках, инкубированных при гипоксии и без указанного редокс-модулятора (Рисунок 6). Кроме этого, необходимо отметить, что в этих условиях инкубации опухолевые клетки линии P19 характеризовались статистически значимым снижением концентрации АФК (H_2O_2) на 66,49 % ($p < 0,05$) и сопоставимым содержанием гидроксильного радикала относительно результатов, полученных в клетках, инкубированных при гипоксии без воздействия NEM (Рисунок 2). 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 на 41,00 % ($p < 0,05$) на фоне сопоставимой концентрации свободных SH-групп белков и белково-связанного глутатиона относительно показателей, полученный в клетках, инкубированных при гипоксии без добавления NEM (Рисунок 7). Дисбаланс системы глутатиона и накопление карбонильных производных белков в опухолевых клетках линии P19, инкубированных в условиях гипоксии и дополнительного внесения NEM, сопровождалось активацией как рецепторного, так и митохондриального пути апоптоза. Это выражалось в статистически значимом увеличении внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} на 195,21 % ($p < 0,05$), количества аннексин- – 812,09 % ($p < 0,05$), TNF RI- – 192,86 % ($p < 0,05$), Fas-положительных клеток – 1450,00 % ($p < 0,05$), а также клеток со сниженным митохондриальным потенциалом на 776,92 % ($p < 0,05$) инкубированных при гипоксии и дополнительном добавлении NEM в среду инкубации опухолевых клеток линии P19 по сравнению с результатами, полученными при гипоксии без воздействия NEM (Рисунок 1, 3, 4). При проведении корреляционного анализа полученных результатов в опухолевых клетках линии P19 в условиях гипоксии и действии NEM нами была установлена статистически значимая сильная отрицательная взаимосвязь между количеством аннексин-положительных клеток и концентрацией свободных SH-групп белков ($r = -0,853$; $p < 0,05$).

При дополнительном внесении DTE в среду инкубирования опухолевых клеток линии P19 в условиях гипоксии нами было установлено статистически значимое увеличение концентрации общего глутатиона (за счет GSH на 34,23 % ($p < 0,05$)) и свободных SH-групп белков на 48,17 % ($p < 0,05$) на фоне снижения содержания белково-связанного глутатиона на 28,85 % ($p < 0,05$) по сравнению с результатами, полученными при гипоксии без добавления указанного редокс-модулятора (Рисунок 5, 7). В работе глутатион-зависимых ферментов наблюдался дисбаланс: активность глутатионредуктазы статистически значимо снижалась на 11,51 % ($p < 0,05$), а активность глутатионпероксидазы, наоборот, увеличивалась на 80,20 % ($p < 0,05$) относительно значений, полученных в клетках, инкубированных при гипоксии без воздействия DTE (Рисунок 6). Разнонаправленное изменение содержания свободных SH-групп белков и активности глутатионредуктазы при указанных условиях инкубирования опухолевых клеток линии P19 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), гидроксильного радикала, ионов Ca^{2+} , количества опухолевых клеток линии P19 со сниженным митохондриальным потенциалом на 37,97 %, 60,68 %, 7,42 %, 80,77 % ($p < 0,05$), соответственно, относительно показателей, полученных в клетках, инкубированных при гипоксии без DTE (Рисунок 1,

2, 4). Однонаправленное снижение содержания АФК и количества аннексин-положительных опухолевых клеток линии P19 при гипоксии и воздействии DTE выражалось в виде установленной нами сильной статистически значимой положительной взаимосвязи этих показателей ($r=+0,871$; $p<0,05$). Кроме этого, в опухолевых клетках линии P19 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 P19 в условиях гипоксии.

При добавлении предшественника синтеза глутатиона – NAC в среду инкубирования опухолевых клеток линии P19 в условиях гипоксии нами было установлено статистически значимое увеличение внутриклеточного содержания общего глутатиона на 20,78 % ($p<0,05$), свободных SH-групп белков – 32,42 % ($p<0,05$) на фоне снижения концентрации белково-связанного глутатиона, карбонильных производных протеинов, ионов Ca^{2+} и числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом на 15,38 %, 69,71 %, 4,88 %, 70,19 % ($p<0,05$), соответственно, а также ингибирования активности глутатионредуктазы на 40,95 % ($p<0,05$) и глутатионпероксидазы на 14,85 % ($p<0,05$) по сравнению с результатами, полученными при гипоксии без добавления указанного редокс-модулятора (Рисунок 4, 5, 6, 7). 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) на 5,93 % ($p<0,05$) относительно показателя при гипоксии без добавления предшественника синтеза глутатиона (Рисунок 2). Однако на выживаемость в аннексиновом тесте изучаемых клеток в условиях гипоксии NAC не оказывал влияния (Рисунок 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушение регуляции апоптотической гибели сопряженное с формированием ОС является одним из звеньев патогенеза опухолевого роста [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2017; Chio I.I.C., Tuveson D.A., 2017; Helfinger V., Schröder K., 2018; Kalinina E.V., Gavriluk L.A., 2020; Tuli H.S. et al., 2023]. 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 [Sinha K. et al., 2013; Chen Y. et al., 2016; Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A., 2016; Guan L. et al., 2024]. 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 [Munro D., Treberg J.R., 2017; Xiao M. et al., 2017; Zhang B. et al., 2022]. Основными АФК, которые образуются в результате этого процесса, являются супероксидный анион-радикал и пероксид водорода [Munro D., Treberg J.R.,

2017; Zou Z. et al., 2017; Herb M. et al., 2021]. Окислительный стресс способствует развитию окислительной модификации белков, отвечающих за активацию метаболических и сигнальных путей, в том числе в реализации и регуляции апоптоза клетки [Mailloux R.J. et al., 2013; Moldogazieva N.T. et al., 2018; Snezhkina A.V. et al., 2019]. Поэтому особое внимание заслуживает изучение триггерных механизмов клеточной гибели опухолевых клеток в условиях гипоксии. В этом случае опухолевая клетка характеризуется нарушением апоптотической гибели [Marengo B. et al., 2016]. Дизрегуляция апоптоза на фоне снижения концентрации кислорода неизбежно сопряжена с изменением редокс-статуса в опухолевых клетках [Briehl M.M. et al., 2014; Munro D. et al., 2018; Wang Y. et al., 2018].

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 [Mailloux R.J. et al., 2013; Mailloux R.J., Treberg J.R., 2016; Dominko K., Đikić D., 2018; Kalinina E., Novichkova M., 2021]. 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 [Bak D.W., Weerapana E., 2015; Moldogazieva N.T. et al., 2018].

Нами было показано усиление ОС на фоне дисбаланса функционирования системы глутатиона. При моделировании условий гипоксии в опухолевых клетках линии P19 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 P19 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 8).

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 P19 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 P19 преимущественно за счет необратимой окислительной модификации белков клетки.



Рисунок 8 – Молекулярные механизмы участия системы глутатиона и окислительной модификации белков в нарушении регуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19 (тератокарцинома мыши С3Н/He) в условиях моделирования гипоксии (по данным [Chen Y. et al., 2016; Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A., 2016; Moldogazieva N.T. et al., 2018; Wang M. et al., 2018] (выделено серым цветом) и результатам собственных исследований)

Воздействие протектора SH-групп пептидов и белков (DTE) в условиях нормоксии в опухолевых клетках линии P19 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 P19 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 P19 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 P19, 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 P19 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 8).

Разнонаправленные эффекты реализации апоптоза в опухолевых клетках линии P19 при действии редокс-модуляторов в условиях нормального и сниженного напряжения кислорода требовали выявления молекулярных механизмов нарушения регуляции запрограммированной гибели опухолевых клеток. Выполненное нами исследование установило участие редокс-статуса опухолевой клетки в механизмах запрограммированной 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 функций.

Таким образом, нами были установлены молекулярные механизмы участия системы глутатиона и окислительно-модифицированных белков в нарушении регуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19 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 СЗН/Не) 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 СЗН/Не) 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 СЗН/Не) 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 СЗН/Не) 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 мышцы СЗН/Не) 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 мышцы СЗН/Не) 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 мышцы СЗН/Не) 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 мышцы СЗН/Не) 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 мышцы СЗН/Не) при нормоксии опосредован участием свободных SH-групп белков. В условиях гипоксии в опухолевых клетках линии P19 (тератокарцинома мышцы СЗН/Не) 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Глутатионилирование белков в опухолевых клетках линии P19 при моделировании гипоксии *in vitro* / Д.С. Орлов, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева, О.Л. Носарева, В.В. Иванов, Е.В. Шахристова // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 8, Ч. 1. – С. 130-131.

2. Изменение системы глутатиона в клетках опухолевой линии P19 при гипоксии / Д.С. Орлов, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, В.В. Иванов // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – Т. 14, № 4. – С. 41-45. Импакт-фактор РИНЦ 0,461

3. Активность ферментов антиоксидантной защиты в опухолевых клетках линии P19 при моделировании гипоксии *in vitro* / Д.С. Орлов, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, В.В. Иванов, Е.В. Шахристова // Материалы VIII Всероссийского с

международным участием конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2015». – Новосибирск, 5-9 октября 2015 г. – Новосибирск : Новосиб. гос. ун-т, 2015. – С. 48.

4. Роль системы глутатиона в реализации пролиферации и апоптоза опухолевых клеток при гипоксии и модуляции редокс-статуса / Е.В. Шахристова, Д.С. Орлов, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, В.В. Иванов, Н.В. Рязанцева // Сборник трудов IX Международной конференции «Биоантиоксидант». – Москва, 29 сентября – 2 октября 2015 г. – Москва : РУДН, 2015. – С. 233-238.

5. Влияние протектора и блокатора тиоловых групп на регуляцию апоптоза опухолевых клеток при гипоксии / Д.С. Орлов, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, В.В. Иванов // Злокачественные опухоли. – 2016. – № 4, спецвыпуск 1. – С. 327-328.

6. Механизмы дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток линии Р19 в условиях модуляции редокс-статуса / Д.С. Орлов, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, В.В. Иванов // **Сибирский онкологический журнал**. – 2016. – Т. 15, № 6. – С. 42-47. Импакт-фактор РИНЦ 0,460

7. Влияние N-ацетилцистеина на окислительную модификацию белков и реализацию апоптоза опухолевых клеток линии Р19 при нормоксии и гипоксии. / Д.С. Орлов, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева // – Acta Nature. – Т. 2, спецвыпуск. – 2016. – С. 191.

8. Редокс-зависимые механизмы дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток при гипоксии / Д.С. Орлов, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, В.В. Иванов // **Сибирский научный медицинский журнал**. – 2017. – Т. 37, № 1. – С. 21-26. Импакт-фактор РИНЦ 0,368

9. Влияние N-этилмалеимида и 1,4-дитиозэритритола на регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии Р19 при гипоксии / Д.С. Орлов, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, М.Ю. Егорова, Д.Ю. Егорова // Сборник материалов XII Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической онкологии» / под ред. Е.Л. Чойнзонова, Э.В. Галажинского, Н.В. Чердынцевой. – Томск, 27-28 апреля 2017 г. – Томск : Изд-во Том. ун-та, 2017. – С. 93-94.

10. Роль N-этилмалеимида в управлении апоптозом опухолевых клеток линии Р19 / Д.С. Орлов, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, В.В. Иванов // Сборник научных трудов «Генетика человека и патология», посвященной 35-летию Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского НИМЦ / под ред. В.А. Степанова. – Томск, 27-30 ноября 2017 г. – Томск : Литературное бюро, 2017. – Вып. 11. – С. 129-130.

11. Митохондриальный и рецептор-зависимый сигнальные пути активации апоптоза опухолевых клеток линии Р19 при гипоксии. / Д.С. Орлов, О.Л. Носарева // Сборник материалов конгресса молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» / под ред. Е.Л. Чойнзонова, Э.В. Галажинского, С.В. Попова, Н.А. Бохана, В.А. Степанова, В.В. Жданова. – Томск, 24-25 мая 2018 г. – Томск : Изд-во Том. ун-та, 2018. – С. 290-291.

12. Роль глутатионирования белков в управлении апоптозом опухолевых клеток линии Р19 при гипоксии. / Д.С. Орлов, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова // Материалы Балтийского симпозиума по иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине с международным участием / под ред. Л.С. Литвиновой, А.Г.

Гончарова. – Калининград, 22-23 ноября 2018 г. – Калининград : Изд-во БФУ им. И. Канта, 2018. – С. 56-59.

13. Состояние системы глутатиона в опухолевых клетках линии P19 при добавлении N-ацетилцистеина в условиях гипоксии. / Д.С. Орлов, О.Л. Носарева, Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая // Acta Nature. – 2019. – Т. 2, спецвыпуск. – С. 213.

14. Молекулярные механизмы влияния N-этилмалеимида и 1,4-дитиоэритритола на регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии P19 при гипоксии. / О.Л. Носарева, Д.С. Орлов, Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2020. – Т. 19, № 2. – С. 72-77. Импакт-фактор РИНЦ 0,777

15. Роль N-ацетилцистеина в регуляции апоптоза опухолевых клеток линии P19 при гипоксии. / О.Л. Носарева, Д.С. Орлов, Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая, А.А. Садыкова // **Сибирский онкологический журнал**. – 2020. – Т. 19, № 3. – С. 102-108. Импакт-фактор РИНЦ 0,560

16. Вовлечение редокс-зависимых механизмов в регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии P19 при нормоксии и гипоксии / О.Л. Носарева, Д.С. Орлов, Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая // Сборник трудов «Типовые патологические процессы: современные тренды в науке», посвященный 130-летию кафедры патофизиологии Императорского (государственного) Томского университета – Томского медицинского института – Сибирского государственного университета / под ред. член-корреспондента РАН О.И. Уразовой. – Томск, 7-8 сентября 2021 г. – Томск : Изд-во «Печатная мануфактура», 2020. – С. 89-90.

17. Роль редокс-статуса системы глутатиона в реализации апоптотической гибели опухолевых клеток линии P19 при гипоксии / Д.С. Орлов // Сборник материалов II Дальневосточной конференции молодых ученых «Медицина будущего» – Владивосток, 24-27 апреля 2023 г. – Владивосток : Издательство Дальневосточного федерального университета, 2023. – С. 293-294.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода,
ДТНБ – 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойная кислота),
НАДФН – никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный,
ОС – окислительный стресс,
ТНБ – тио-2-нитробензойную кислоту,
DTE – 1,4-дитиоэритритол,
Fas – апоптозный антиген 1,
GSH – восстановленный глутатион,
GSSG – окисленный глутатион,

JS-1 – 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин йодид,
МТТ – 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид,
n – размер выборки,
NAC – N-ацетилцистеин,
NEM – N-этилмалеимид,
TNF RI – tumor necrosis factor receptor I type, рецептор фактора некроза опухоли I типа.