

На правах рукописи

Кайгородова Евгения Викторовна

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯТОРНОГО ВЛИЯНИЯ  
БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА НА АПОПТОЗ  
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Томск – 2012

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

**Научные консультанты:**

доктор медицинских наук, профессор      Рязанцева Наталья Владимировна

доктор медицинских наук, профессор,  
академик РАМН,  
Заслуженный деятель науки РФ      Новицкий Вячеслав Викторович

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор,      Федорова Татьяна Сергеевна

доктор медицинских наук,  
профессор,      Кондакова Ирина Викторовна

доктор медицинских наук      Литвинова Лариса Сергеевна

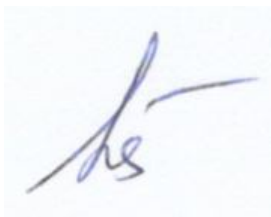
**Ведущая организация:** Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии Российской академии медицинских наук (г. Москва)

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2012 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (634050 г. Томск, Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2012 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Петрова И.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Значимость программированной клеточной гибели определяется ее участием во многих процессах, лежащих в основе жизнедеятельности макроорганизма. Эндогенная регуляция апоптоза или его регуляция внешними воздействиями является актуальным аспектом теоретических и практических исследований. Срыв механизмов индукции апоптоза может приводить к его ингибированию или, напротив, к неадекватному активированию и лежать в основе патогенеза различных заболеваний [Feitelson M.A. et al., 1998; Ярилин А.А., 2001; Freeman A.J. et al., 2001; Фильченков А.А., 2003; Kroemer G., Galluzzi L. et al., 2009; Рязанцева Н.В. и соавт., 2009, 2011]. Ингибированием апоптоза сопровождаются опухолевый процесс, аутоиммунные заболевания, вирусные инфекции, а при нейродегенеративных, сердечно-сосудистых, некоторых заболеваниях печени и почек, лучевой болезни происходит, напротив, активация программированной гибели клеток [Elsässer A. et al., 2000; Швембергер И.Н., Гинкул А.Б., 2002; Новицкий В.В. и соавт., 2006; Рязанцева Н.В. и соавт., 2006, 2009, 2011]. С позиции дисрегуляции апоптоза можно объяснить патогенез многих заболеваний человека, так как нарушение баланса между пролиферацией и программированной клеточной гибелью приводит к патологическим процессам в органах и тканях [Meldrum D.R., 1998; Ярилин А.А. и соавт., 2000; Kalkeri G. et al., 2001; Гончарова И.А. и соавт., 2006; Новицкий В.В. и соавт., 2010].

Механизмы, оказывающие влияние на запуск и регуляцию процессов апоптоза, весьма многочисленны и разнообразны. Известно, что после индукции апоптоза дальнейшая судьба клетки – гибель или выживание – зависит от наличия или активации многочисленных факторов и процессов, модулирующих программированную клеточную гибель. К ним можно отнести как постоянно существующие в клетке белки, такие как семейство Bcl-2 и IAP, так и индуцируемые стрессом молекулы: факторы регуляции транскрипции NF- $\kappa$ B и p53, церамид, стрессиндуцируемые киназы JNK, p38 и ERK [Москалева Е.Ю., Северин С.Е., 2006; Рязанцева Н.В. и соавт., 2009].

Наиболее важное значение среди стрессиндуцируемых молекул имеют белки теплового шока (Heat shock proteins - Hsps). Эти протеины участвуют в формировании правильной трехмерной конформации вновь синтезированных полипептидов, поддерживают функциональную активность внутриклеточных белков и элиминацию поврежденных белковых форм, а также обеспечивают транспорт протеинов через клеточные мембраны, процессы ассоциации-диссоциации внутриклеточных надмолекулярных комплексов, защиту белков от агрегации. Кроме этого, белки теплового шока обладают анти- и проапоптотической функцией [Arya R. et al., 2007; Lanneau D. et al., 2008; Sherman M., Multhoff G., 2008; Foster C.S. et al., 2009; Richardson P.G. et al., 2011]. Наиболее изучены свойства белка теплового шока Hsp70; шаперонам Hsp90 и Hsp27, к сожалению, в настоящее время уделено гораздо меньшее внимание.

В последнее время именно белкам теплового шока отводят существенную роль в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток. В отличие от нормальных (нетрансформированных клеток), где экспрессия стресс-индуцибельных Hsps находится на довольно низком или несущественном уровне, в большинстве опухолевых клеток, включая лимфатические болезни, хронические или острые миелоидные лейкомии, Hsps экспрессируются особенно активно. Повышенная экспрессия генов Hsp27 и Hsp90 коррелирует с плохим прогнозом острой миелоидной лейкомии и миелоидными дисплазийными синдромами [Thomas X. et al., 2005; Duval A. et al., 2006]. В клетках острой миелоидной лейкомии Hsp27 предотвращает лекарственно-индуцированный апоптоз [Scherpers H. et al., 2005]. В многочисленных клетках миеломы угнетение активности или снижение содержания Hsp27 может восстановить апоптотический ответ на дексаметазон через активацию каспазозависимого пути [Chauhan D. et al., 2003].

Посттрансляционные модификации белков теплового шока и/или присутствие их в каком-либо клеточном компартменте играют важную роль в направленном взаимодействии Hsp с определенным участником апоптоза [Lanneau D. et al., 2008]. Функции Hsp27 зависят от четвертичной структуры олигомера, изменения которого регулируются фосфорилированием белка. J.M. Bruey et al. [2000] в своих исследованиях *in vitro* и *in vivo* показали, что Hsp27-опосредованное ингибирование каспазозависимого апоптоза включает в себя большое количество нефосфорилированных олигомеров Hsp27. Напротив, фосфорилированная форма белка теплового шока 27 непосредственно взаимодействует с DAXX (Death-Domain Associated protein) [Charette S. et al., 2000]. Данные результаты говорят о том, что олигомеризация/фосфорилирование протеинов изменяет конформацию Hsps и, следовательно, определяет их способность к взаимодействию с различными апоптотическими белками [Khan I.U. et al., 1998; Negroni L. et al., 2007].

Важную роль в регуляции апоптотической программы играют также особенности локализации белков теплового шока в клетке [Tsuchiya A. et al., 2005; Schmitt E. et al., 2007; Lanneau D. et al., 2008]. Показано, что основное антиапоптотическое действие Hsps осуществляют в цитоплазме, но появление данных шаперонов в ядре, митохондриях или плазматической мембране может усилить запрограммированную клеточную смерть, повлиять на процесс пролиферации или облегчить контакт с дендритными клетками (повысить иммуногенность клетки) [Bruey J.M. et al., 2000; Tsuchiya A. et al., 2005; Свешников П.Г. и соавт., 2007; Lin L. et al., 2007; Ribeil J.A. et al., 2007; Sashchenko L.P. et al., 2007; Richardson P.G. et al., 2011].

Судя по накопленному к настоящему времени фактическому материалу, про- и антиапоптогенные функции белков теплового шока зависят от их посттрансляционной модификации, внутриклеточной локализации и типа клеток. Регулирование апоптоза с помощью Hsps является защитным механизмом, который уменьшает клеточную чувствительность к неблагоприятным факторам и позволяет клеткам выжить, в том числе и опухолевым. Изучение системы Hsps и ее регуляторных механизмов является актуальной задачей медицины, поскольку позволит установить пути

ускользания конкретных опухолевых клеток от апоптоза при помощи Hsp90 и может быть положено в основу таргетной терапии злокачественных заболеваний.

**Цель исследования:** установить роль белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в механизмах нарушения программированной гибели опухолевых клеток линий Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз человека) и ТНР-1 (острая моноцитарная лейкемия человека).

**Задачи исследования:**

1. Дать комплексную сравнительную характеристику экспрессии генов и особенностей содержания фосфорилированных форм Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках линий Jurkat, ТНР-1 и в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров; установить взаимосвязь изменения содержания белков теплового шока (27 и 90 кДа) и апоптотической гибели клеток.

2. Идентифицировать молекулярные мишени модификации рецепторопосредованного пути дизрегуляции апоптоза с участием белков теплового шока на уровне TNF- и Fas-рецепторов, их лигандов и каспаз -3, -8.

3. Применяя технологию селективного ингибирования Hsp27 и Hsp90 с использованием 17-AAG (17-(Allylamino)geldanamycin) и KRIBB-3 (5-(5-Ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl) isoxazole) *in vitro*, оценить роль белков теплового шока в дизрегуляции митохондриального пути апоптоза опухолевых клеток линий ТНР-1 и Jurkat.

4. Установить характер влияния Hsp27 и Hsp90 на факторы транскрипции p53 и NF-κB в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1.

5. Выявить общие закономерности и особенности участия белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в дизрегуляции программированной гибели опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1 при модуляции апоптоза *in vitro* с использованием рекомбинантного TNFα, этопозида и дексаметазона.

**Научная новизна.** Получены принципиально новые данные фундаментального характера о роли белков теплового шока (Hsp27 и Hsp90) в дизрегуляции митохондриального, рецепторного и ядерного путей апоптоза, об уровне экспрессии мРНК и особенностях содержания фосфорилированных форм Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии, а также в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров. Впервые показано, что опухолевые клетки линий Jurkat и ТНР-1 характеризуются повышенным уровнем экспрессии генов и высоким содержанием фосфорилированных форм Hsp27, низким уровнем фосфорилированных форм Hsp90, по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров. Выявлено, что белки теплового шока Hsp27 и Hsp90 играют антиапоптотическую роль в опухолевых клетках Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии. Молекулярные механизмы антиапоптотического действия Hsp27 и Hsp90 включают в себя снижение активности каспаз-8 и -3, уменьшение количества TNF- и Fas-рецепторов, изменение уровня факторов транскрипции p53 и NF-κB, а также нарушение баланса про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в пользу

последних, и как следствие, препятствие снижению уровня трансмембранного потенциала митохондрий.

Впервые показано, что действие этопозида в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 приводит к увеличению уровня мРНК Hsp90 в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1, снижению уровня мРНК Hsp27 (в опухолевых клетках линии Jurkat) и уменьшению количества фосфорилированных форм Hsp90 и Hsp27 в клетках обеих линий.

Получены приоритетные данные о проапоптотическом действии специфических ингибиторов белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 (KRIBB-3 и 17-AAG, соответственно) в интактных опухолевых клетках Т-лимфобластного лейкоза, моноцитарной лейкемии и отсутствии данного эффекта в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров. Впервые показано, что селективные ингибиторы Hsp27 и Hsp90 потенцируют проапоптотическое действие цитостатика (этопозид), глюкокортикоида (дексаметазон) и рекомбинантного TNF $\alpha$  человека в опухолевых клетках Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии, а также в мононуклеарных лейкоцитах *in vitro*.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты проведенного исследования расширяют существующие представления о фундаментальных механизмах нарушения апоптоза опухолевых клеток. Получены новые данные о роли белков теплового шока (Hsp27 и Hsp90), экспрессии их мРНК и содержании фосфорилированных форм шаперонов в дизрегуляции митохондриального, рецепторного и ядерного путей апоптоза опухолевых клеток Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии. В результате выполненной работы разработаны принципиально новые подходы к решению проблемы, связанной с созданием молекулярной технологии коррекции нарушения апоптоза опухолевых клеток на основе использования в качестве молекулярных мишеней белков теплового шока 27 и 90 кДа. По итогам исследования оформлено 1 ноу-хау «Способ управлением программированной гибелью опухолевых клеток с помощью ингибиторов белков теплового шока» (№185 от 24.06.2011).

Полученные знания в дальнейшем могут способствовать созданию новых технологий таргетной терапии опухолевых заболеваний, в частности Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Реализация антиапоптотической функции белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 зависят от их посттрансляционной модификации (фосфорилирования). Программированная гибель опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1 угнетается на фоне высокого содержания фосфорилированных форм Hsp27 и низкого уровня фосфорилированных форм Hsp90, по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров.

2. Белки теплового шока Hsp27 и Hsp90 участвуют в блокировании запуска рецепторопосредованного, ядерного и митохондриального путей реализации апоптоза, опосредуя свое действие через снижение активности

каспаз-3 и -8, угнетение презентации TNFR1- и Fas-рецепторов, изменение содержания факторов транскрипции p53 и NF-kB, баланса белков семейства Bcl-2 и трансмембранного потенциала митохондрий в опухолевых клетках линий Jurkat и THP-1.

3. Белки теплового шока Hsp90 и Hsp27 являются молекулярными мишенями для таргетного воздействия на программированную гибель опухолевых клеток T-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии.

### **Апробация и реализация работы**

Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на VI Международном конгрессе патофизиологов (г. Монреаль, Канада, 2010); Первой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (г. Санкт-Петербург, Россия, 2010); на 12, 13 и 14 Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы медицины» (г. Абакан, 2009, 2010, 2011гг); IV Международной научной конференции молодых ученых-медиков (г. Курск, Россия, 2010); XVI Межгородской конференции «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 2010); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки» (г. Ярославль, 2010); конференции «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (г. Санкт-Петербург, 2010); III Общероссийской научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине» (г. Сочи, 2010); V, VI Международной Пироговской научной медицинской конференции (г. Москва, 2010, 2011гг.); XII Конгрессе молодых учёных и специалистов с международным участием «Науки о человеке» (г. Томск, 2011); на Международной телеконференции «Проблемы и перспективы современной науки» (г. Томск, 2011); на VI региональной конференции молодых ученых-онкологов, посвященную памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (г. Томск, 2011); на Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Пущино, 2011).

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в лекциях по патологической физиологии (разделы, «Патофизиология иммунной системы», «Патофизиология клетки») для студентов 2-3 курсов лечебного и педиатрического факультетов, внедрены в учебный процесс кафедры фундаментальных основ клинической медицины в разделы дисциплин «Молекулярные основы патологии», «Современные проблемы медико-биологической науки» для студентов медико-биологического факультета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России.

В работе приводятся результаты исследований, поддержанных Советом по грантам при Президенте РФ для поддержки молодых кандидатов наук по проблеме «Исследование молекулярных механизмов регуляторного влияния белков теплового шока на апоптоз опухолевых клеток» (ГК№16.120.11.480 –

МК), гранта Carl Zeiss "Программа поддержки научно-исследовательской работы молодых ученых" № СибГМУ 1/11 КУ ("Модуляция апоптоза опухолевых и нормальных лимфоцитов ингибиторами белков теплового шока"), гранта РФФИ «Разработка способов направленной коррекции дизрегуляции пролиферации и апоптоза нормальных и патологически измененных клеток с помощью регуляторных молекул» (РФФИ 09-04-99025), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» («Идентификация молекулярных мишеней коррекций нарушений регуляции апоптоза опухолевых клеток» - ГК № П1203 от 27.08.09; «Разработка технологической платформы молекулярной диагностики и лечения социально-значимых заболеваний и подготовка на ее основе научно-исследовательских кадров для молекулярной медицины» - ГК 02.740.11.0311).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 35 работ, в том числе 1 монография и 16 статей – в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 256 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы (глава 1), материала и методов исследования (глава 2), результатов исследований и их обсуждения (главы 3-8), заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 42 рисунками; список литературы включает 496 источников, из которых 76 отечественных и 420 иностранных.

**Личный вклад автора.** Анализ данных литературы по теме диссертации, планирование исследования, определение цели, задач, выбор методов исследования, проведение экспериментального и клинического блоков настоящей работы, статистический анализ результатов и написание диссертации выполнены лично автором.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В диссертационной работе представлены результаты исследования опухолевых клеток линий Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз человека) и ТНР-1 (острая моноцитарная лейкемия человека), полученных из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург), а также мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови у относительно здоровых доноров (20 мужчин и 27 женщин в возрасте от 18 до 35 лет). Критериями включения обследованных в программу исследования являлись: отсутствие в анамнезе хронических инфекционных заболеваний, обострения хронических соматических заболеваний, а также злокачественных новообразований, психических расстройств, алкогольной и наркотической зависимости; возраст от 18 и до 50 лет; наличие информированного согласия. Материалом для исследования служила венозная кровь обследованных лиц, забор которой осуществляли утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл и стабилизировали гепарином (25 Ед/мл). При проведении ПЦР «в реальном времени» венозную кровь стабилизировали ЭДТА. Мононуклеарные лейкоциты выделяли из крови путем центрифугирования на слое фиколла («GE



Healthseare», Швеция) плотностью  $1,077 \text{ г/см}^3$ . Выделенные мононуклеарные лейкоциты инкубировали в течение 18 ч при температуре  $37^\circ\text{C}$  в полной питательной среде. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью 0,5% трипанового синего («Dia-M», Германия). Для исследования влияния белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 на апоптоз опухолевых клеток применяли их специфические ингибиторы 17-ААG (17-(Allylamino)geldanamycin) («Sigma-Aldrich», США) и KRIBB3 (5-(5-Ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)isoxazole) («Sigma-Aldrich», США), соответственно.

Исследование проводилось на базе Научно-образовательного центра молекулярной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (руководитель – канд.мед.наук О.Е. Чечина).

Культивирование клеток проводили суспензионным методом в полной питательной среде, содержащей 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Invitrogen», США), инактивированной при  $56^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, 0,3 мг/мл L-глутамин («Вектор-Бест», Россия) при температуре  $37^\circ\text{C}$  и в 5% атмосфере  $\text{CO}_2$ .

Распределение исследованных клеточных культур опухолевых линий Jurkat и ТНР-1, а также мононуклеарных лейкоцитов крови, полученных у здоровых доноров, в соответствии с использованными методами исследования представлено в таблице 1.

Выделение РНК из мононуклеарных лейкоцитов крови осуществляли с применением гуанидин изотиоционата с последующей фенол-хлороформной экстракцией с помощью набора «РИБО-золь-В» (Россия).

Определение уровня экспрессии мРНК генов hsp27 и hsp90 в опухолевых клетках и в мононуклеарных лейкоцитах осуществляли с помощью метода ПЦР «в реальном времени» с использованием специфических праймеров («Биосан», Россия) и SYBR Green I на амплификаторе Mini Opticon («Bio-Rad», США). Результаты выражали в условных единицах (отношение числа циклов амплификации исследуемого гена к количеству циклов амплификации генов «домашнего хозяйства»  $\beta$ -актина и RPL32).

Уровень фосфорилированной и нефосфорилированной формы Hsp27 и Hsp90, белков Bcl-2, Bax, Bad, P53 и NF- $\kappa$ B в лизатах клеток определяли методом вестерн-иммуноблоттинга, используя первичные моноклональные антитела к данным белкам («Abcam», Великобритания) и вторичные антитела, конъюгированные с HRP. Детекцию результатов осуществляли с помощью хемилюминесцентного субстрата Novex («Invitrogen», США) на рентгеновской пленке («Kodak X-ray film», США). Вывод о содержании исследуемого белка в клетке делали по изменению отношения величины сигнала метки искомого белка к величине сигнала с фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, используя программное обеспечение TotalLab. Результаты выражали в условных единицах.

Оценку апоптоза проводили методом флуоресцентной микроскопии на микроскопе «AxioStar plus» («Carl Zeiss», Германия) с использованием FITC-меченного аннексина V и пропидий иодида («Abcam», Великобритания) согласно инструкции фирмы-производителя. Метод основан на способности

FITC-меченного аннексина V специфически связываться с фосфатидилсеринном и пропидия иодида (PI) интерколорировать с молекулой ДНК. Подсчет количества FITC+/PI- и FITC+/PI+-меченных лимфоцитов осуществляли на 200-300 клеток и выражали в процентах.

Таблица 1

**Распределение исследованных культур опухолевых клеток линий Jurkat, ТНР-1 и мононуклеарных лейкоцитов (МНЛ) крови здоровых доноров в соответствии с использованными методами исследования**

| Методы исследования  | Условия культивирования клеток  | Исследованные клеточные культуры |       |     |
|--|---|----------------------------------|-------|-----|
|  |   | Jurkat                           | ТНР-1 | МНЛ |
| 1  | 2   | 3                                | 4     | 5   |
| Оценка экспрессии мРНК генов белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 методом ПЦР «в реальном времени»                        | Интактные клетки  | 10                               | 10    | 10  |
|  | С индуктором апоптоза (дексаметазон / этопозид)   | 20                               | 20    | 20  |
| Определение содержания Hsp27, Hsp90 и их фосфорилированных форм методом вестерн-блоттинга                                | Интактные клетки  | 12                               | 12    | 12  |
|  | С индуктором апоптоза (дексаметазон / этопозид)   | 24                               | 24    | 24  |
| Определение количества апоптотически измененных клеток в аннексиновом тесте методом флуоресцентной микроскопии           | Интактные клетки  | 25                               | 25    | 45  |
|  | С ингибитором Hsp27 (KRIBB3) / Hsp90 (17-AAG)   | 30                               | 30    | 45  |
|  | С индуктором апоптоза (rTNFальфа / этопозид / дексаметазон)   | 30                               | 30    | 45  |
|  | С ингибитором Hsp27 (KRIBB3) / Hsp90 (17-AAG) и индуктором апоптоза (rTNFальфа / этопозид / дексаметазон) | 30                               | 30    | 30  |
| Определение числа клеток со сниженным уровнем трансмембранного потенциала митохондрий методом проточной цитофлуориметрии | Интактные клетки  | 10                               | 10    | 10  |
|  | С ингибитором Hsp27 (KRIBB3) / Hsp90 (17-AAG)   | 20                               | 20    | 20  |
|  | С индуктором апоптоза (rTNFальфа / этопозид / дексаметазон)   | 15                               | 15    | 20  |
|  | С ингибитором Hsp27 (KRIBB3) / Hsp90 (17-AAG) и индуктором апоптоза (rTNFальфа / этопозид / дексаметазон) | 15                               | 15    | 20  |
| Определение активности каспаз-3 и -8 методом   | Интактные клетки  | 16                               | 16    | 16  |

|  |   |    |    |    |
|--|---|----|----|----|
| спектрофотометрии и их активных форм методом иммуноферментного анализа                               | С ингибитором Hsp27 (KRIBB3) / Hsp90 (17-AAG)   | 38 | 38 | 38 |
|  | С индуктором апоптоза (rTNFальфа / этопозид / дексаметазон)   | 30 | 30 | 30 |
|  | С ингибитором Hsp27 (KRIBB3) / Hsp90 (17-AAG) и индуктором апоптоза (rTNFальфа / этопозид / дексаметазон) | 30 | 30 | 30 |
| Исследование содержания белков семейства Bcl-2 (Bad, Bax, Bcl-2) методом вестерн-блоттинга           | Интактные клетки  | 9  | 9  | 9  |
|  | С ингибитором Hsp27 (KRIBB3) / Hsp90 (17-AAG)   | 18 | 18 | 18 |
|  | С индуктором апоптоза (rTNFальфа / этопозид / дексаметазон)   | 18 | 18 | 18 |
|  | С ингибитором Hsp27 (KRIBB3) / Hsp90 (17-AAG) и индуктором апоптоза (rTNFальфа / этопозид / дексаметазон) | 18 | 18 | 18 |
| Исследование содержания факторов транскрипции P53 и NF-каппа-B методом вестерн-блоттинга             | Интактные клетки  | 8  | 8  | 8  |
|  | С ингибитором Hsp27 (KRIBB3) / Hsp90 (17-AAG)   | 12 | 12 | 12 |
|  | С индуктором апоптоза (rTNFальфа / этопозид / дексаметазон)   | 18 | 18 | 18 |
|  | С ингибитором Hsp27 (KRIBB3) / Hsp90 (17-AAG) и индуктором апоптоза (rTNFальфа / этопозид / дексаметазон) | 18 | 18 | 18 |
| Определение количества TNFR1, FasR- и FasL - положительных клеток методом проточной цитофлуориметрии | Интактные клетки  | 25 | 28 | 31 |
|  | С ингибитором Hsp27 (KRIBB3) / Hsp90 (17-AAG)   | 30 | 30 | 30 |
|  | С индуктором апоптоза (rTNFальфа / этопозид / дексаметазон)   | 45 | 45 | 45 |
|  | С ингибитором Hsp27 (KRIBB3) / Hsp90 (17-AAG) и индуктором апоптоза (rTNFальфа / этопозид / дексаметазон) | 45 | 45 | 45 |
| Определение концентрации TNF- $\alpha$ , sTNF-R1 методом иммуноферментного анализа                   | Интактные клетки  | 19 | 18 | 17 |
|  | С ингибитором Hsp27 (KRIBB3) / Hsp90 (17-AAG)   | 40 | 40 | 40 |
|  | С индуктором апоптоза (этопозид / дексаметазон)   | 20 | 20 | 20 |
|  | С ингибитором Hsp27 (KRIBB3) / Hsp90 (17-AAG) и индуктором апоптоза (этопозид / дексаметазон)             | 40 | 40 | 40 |

Количество TNFR1-, FasR и FasL-презентирующих клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии с помощью набора моноклональных антител к человеческому антигену CD120, CD95 (Fas/APO-1) и FasL («Invitrogen», США) на цитофлуориметре FACSCanto II («Becton Dickinson», США). Результаты выражали в % от общего числа клеток.

Уровень sTNF-R и TNF $\alpha$  в супернатантах опухолевых клеток Jurkat оценивали методом иммуноферментного анализа по протоколу фирмы-производителя («Bender MedSystem», Австрия). Измерения проводили при 450 нм на микропланшетном фотометре Multiscan EX («Thermo LabSystem», Финляндия). Количество sTNF-R и TNF $\alpha$  в супернатантах опухолевых клеток линии Jurkat определяли по калибровочной кривой и выражали в нг/мл и пг/мл, соответственно.

Активность каспаз -8 и -3 определяли спектрофотометрическим методом с использованием набора реактивов фирмы «Abscam» (Великобритания). Анализ основан на спектрофотометрической детекции хромофора p-nitroanilide (p-NA), который отщепляется под действием каспазы-8 из субстрата IETD-pNA или под действием каспазы-3 из субстрата DEVD-pNA. Эмиссию света pNA измеряли при длине волны 400 и 405 нм. Активность каспаз выражали в условных единицах, что соответствовало отношению оптической плотности к количеству белка в пробе. Концентрацию белка в пробе определяли методом Бретфорда.

Количество клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий ( $\Delta\psi$ ) регистрировали с помощью набора реагентов «MitoScreen» («BD Pharmigen», США) на цитофлуориметре FACSCanto II («Becton Dickinson», США). Результаты выражали в % от общего числа клеток.

Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью программы SPSS 11.5. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро-Вилка. Для каждого анализируемого показателя вычисляли среднее (M) и стандартное отклонение ( $\sigma$ ) (для выборок, распределённых по нормальному закону), а также медиану (Me) и квартили ( $Q_1$ - $Q_3$ ) (для выборок, не подчиняющихся нормальному закону). Анализ независимых количественных данных, подчиняющихся нормальному закону распределения, проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Для оценки достоверности различий между независимыми количественными выборками, не имеющих нормального закона распределения, применяли непараметрический критерий Крускала-Уолиса. В случае обнаружения статистически значимых различий между группами проводили попарный анализ с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. При анализе использовали метод корреляционного анализа Спирмена. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

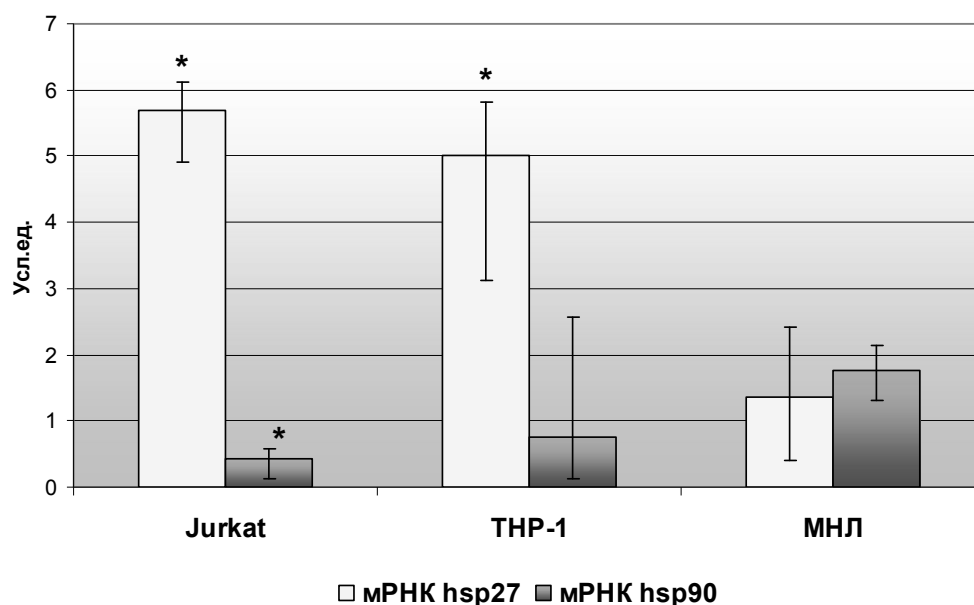
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Особенности экспрессии генов и фосфорилированного статуса белков теплового шока (Hsp90 и Hsp27) в опухолевых клетках

Уровень экспрессии Hsp отличается у разных типов клеток. В современной литературе не существует, к сожалению, систематики организмов, органов и тканей по этому параметру, однако, известно, что внутриклеточное содержание Hsp прямо коррелирует со способностью клеток противодействовать повреждающим внешним факторам. Учитывая важную роль Hsp в поддержании

жизнеспособности клеток, можно предположить, что уровень экспрессии генов белков теплового шока является существенной характеристикой, отражающей как предшествующие условия жизнедеятельности клеток, так и их потенциальные возможности эффективного функционирования [Morimoto R.I. et al., 1998; Csermely P., 2007].

В результате проведенного исследования было показано, что в опухолевых клетках линии Jurkat и ТНР-1 уровень экспрессии мРНК hsp27 был в 4 раза выше, чем в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров (рис.1). Уровень мРНК гена hsp90 составлял 0,44 (0,12–0,57) усл. ед. в опухолевых клетках линии Jurkat; 0,76 (0,13–2,56) усл. ед. - в опухолевых клетках линии ТНР-1 и 1,77 (1,31–2,13) усл. ед. - в мононуклеарных лейкоцитах у здоровых доноров. При этом статистически значимые различия данного параметра были обнаружены лишь в культуре мононуклеарных лейкоцитов и клетках линии Jurkat ( $p < 0,05$ ).



**Рис.1** Уровень экспрессии мРНК генов белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках линий Jurkat, ТНР-1 и мононуклеарных лейкоцитах (МНЛ)

**Примечание:** \* - достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями в культуре мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров ( $p < 0,05$ ); на гистограмме для каждой группы представлены медиана, 25% и 75% кватили

Показано, что индукция синтеза белков теплового шока характерна для многих видов опухолей. Повышенная экспрессия Hsp в опухолевых клетках играет ключевую роль в их защите от апоптоза, а также лежит в основе быстрой пролиферации, прогрессирования и метастазирования опухолей. В раковых клетках экспрессия Hsp27 и/или Hsp70 аномально высока. Установлено, что Hsp27 и Hsp70 могут участвовать в онкогенезе и обеспечивать устойчивость к химиотерапии. Как правило, повышенная экспрессия мРНК Hsps коррелирует с клинической тяжестью опухолей, плохим прогнозом и устойчивостью к терапии

[Garrido C. et al., 2006; Schmitt E et al., 2007; Romanucci M. et al., 2008; Flandrin P. et al., 2008; Lu W.J. et al., 2009; Mahalingam D. et al., 2009].

Полученные нами результаты, показывающие повышенный уровень экспрессии мРНК Hsp27 в опухолевых клетках Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами у здоровых доноров, согласуются с данными литературы. Отсутствие различий в уровне экспрессии мРНК Hsp90 в опухолевых клетках ТНР-1 и в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, а также сниженный уровень экспрессии мРНК Hsp90 в клетках линии Jurkat можно объяснить тем, что, вероятно, существует специфическая активация фактора транскрипции HSF-1, зависящая от типа клеток. Белок теплового шока Hsp90 является конститутивным белком, который постоянно присутствует и синтезируется во всех клетках организма в различных количествах [Frydman J., 2001; Dai C. et al., 2007]

Немаловажную роль в поддержании функциональной активности белков теплового шока играют их посттрансляционные и конформационные изменения.

К посттрансляционным модификациям, регулирующим функциональную активность Hsp90, относят фосфорилирование, которое регулирует шаперонную функцию Hsp90 и вызывает диссоциацию белка-мишени из комплекса с шапероном, а также, вероятно, обеспечивает правильное сворачивание его субстратов [Zhao Y.G. et al., 2001].

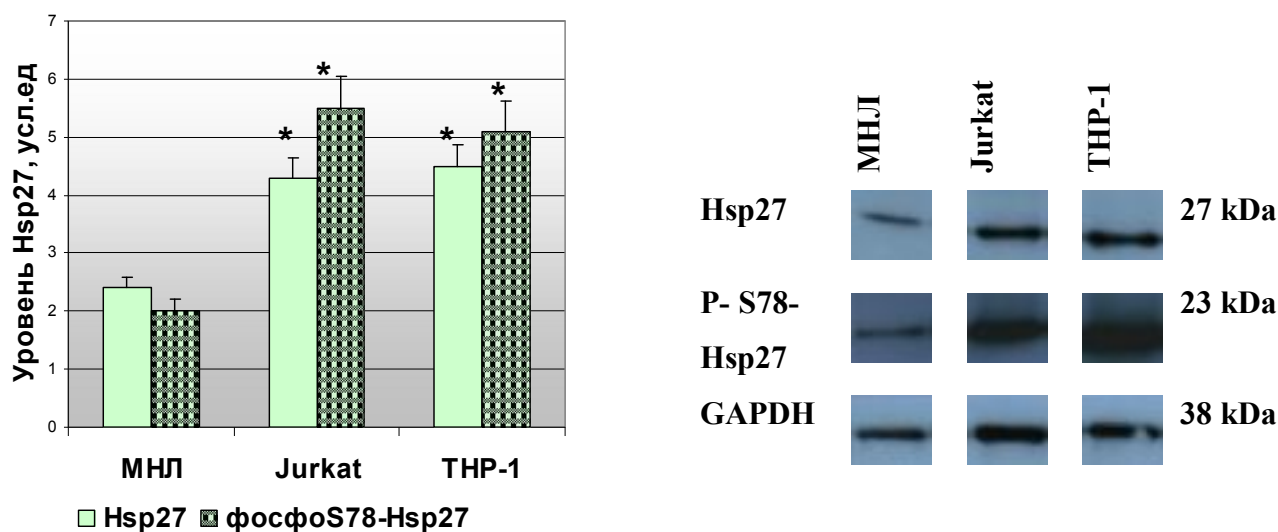
В результате проведенного нами вестерн-блотт анализа было показано, что содержание белка Hsp27 и его активной формы (фосфорилированной по остатку сер78) было значительно выше в опухолевых клетках, чем в мононуклеарных лейкоцитах (рис.2).

Уровень Hsp27 и фосфоS27-Hsp27 в опухолевых клетках ТНР-1 был также статистически выше, чем в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, и не отличался от аналогичного параметра в клетках линии Jurkat (рис.2).

Исследование внутриклеточного уровня белка теплового шока Hsp90 показало, что в мононуклеарных лейкоцитах у здоровых доноров значения данного параметра достоверно не отличались от его содержания в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 ( $p=0,625$ ). Стоит отметить, что содержание фосфорилированной формы белка Hsp90 (фосфо S226-Hsp90) составило  $8,55 \pm 0,19$  усл. ед. в мононуклеарных лейкоцитах у здоровых доноров,  $7,04 \pm 0,86$  усл. ед. – в клетках линии Jurkat и  $4,00 \pm 0,21$  усл. ед. – в клетках линии ТНР-1, соответственно ( $p < 0,05$ ) (рис. 3).

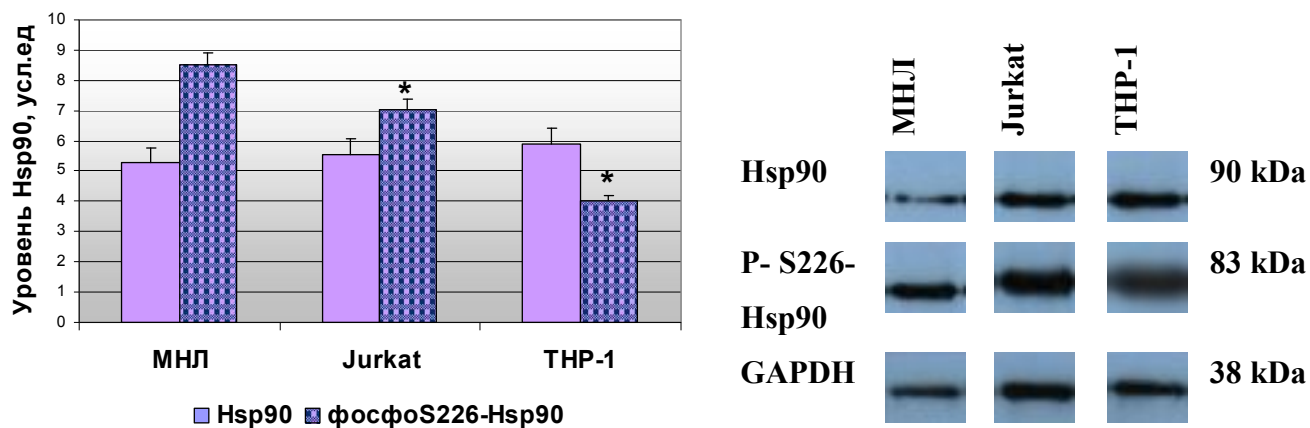
Можно предположить, что различия в уровне фосфорилированных форм Hsp27 и Hsp90 в исследованных клетках, возможно, является следствием конститутивной активации протеинкиназ, таких как MAPK (mitogen-activated protein kinase) и PKB/Akt (protein kinase B). Известно, что наиболее высокий уровень фосфорилирования Hsp90 достигается при физиологических условиях. В лейкозных клетках низкая степень фосфорилирования Hsp90 может быть связана с мутацией в сайтах фосфорилирования или с гиперэкспрессией

лейкемогенных тирозиновых киназ (Bcr-Abl, FLT3/D835Y и Tel-PDGFR), которые подавляют фосфорилирование Hsp90 [Kurokawa M. et al., 2008].



**Рис. 2** Содержание фосфорилированных и нефосфорилированных форм Hsp27 в опухолевых клетках линии Jurkat, THP-1, а также в мононуклеарных лейкоцитах (МНЛ), определенные методом вестерн-блоттинга

**Примечание (здесь и на рис.3):** \* - достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями в культуре мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров ( $p < 0,05$ ); GAPDH-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа



**Рис. 3** Содержание фосфорилированных и нефосфорилированных форм Hsp90 в опухолевых клетках линии Jurkat, THP-1, а также в мононуклеарных лейкоцитах (МНЛ), определенные методом вестерн-блоттинга

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о значимо повышенной экспрессии гена белка теплового шока 27 и его фосфорилированной формы в опухолевых клетках Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии, по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров. Уровень экспрессии мРНК Hsp90 в

моноклеарных лейкоцитах у здоровых доноров и линии ТНР-1 различается не значимо, а в опухолевых клетках линии Jurkat данный параметр снижен, в то время как содержание фосфорилированной формы Hsp90 в обеих опухолевых линиях оказалось достоверно ниже, чем в моноклеарных лейкоцитах у здоровых доноров. В целом, данные литературы, касающиеся особенностей экспрессии генов белков теплового шока и молекулярных механизмов их действия в опухолевых клетках, весьма противоречивы. В связи с этим, на следующем этапе исследования нам представилось целесообразным оценить молекулярные механизмы регуляторной роли белков теплового шока на апоптоз опухолевых и нетрансформированных клеток.

## **2. Роль белков теплового шока (Hsp90 и Hsp 27) в регуляции рецепторного пути апоптоза опухолевых клеток**

Выделяют три пути запуска программированной клеточной гибели – рецепторный, митохондриальный и ядерный (p53-опосредованный); эти пути, как правило, не реализуются изолированно, а дополняют и усиливают друг друга [Пальцев М.А., 2004; Рязанцева Н.В. и соавт., 2010].

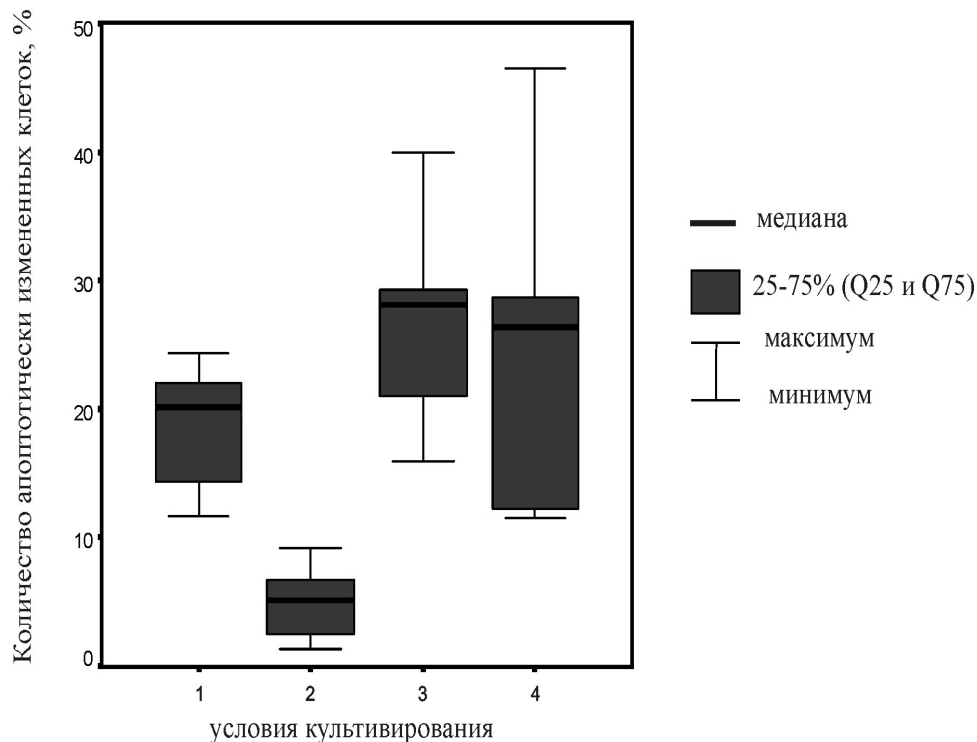
Рецептор-опосредованный путь апоптоза запускается при связывании специфических лигандов с рецепторами семейства фактора некроза опухоли (TNF), расположенными на плазматической мембране. Наиболее изученными рецепторами данного семейства являются FasR (CD95/Apo1) и TNFR1 (p60/p55), относящиеся к трансмембранным гликопротеинам I типа [Zhang G., 2004; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008].

На данном этапе исследования осуществлялся подбор апоптотических доз селективных ингибиторов Hsp90 и Hsp27 (17-AAG (17-(Allylamino)geldanamycin) и KRIBB3 (5-(5-Ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl) isoxazole), соответственно).

Результаты аннексинового теста, проведенного методом флуоресцентной микроскопии, показали, что количество клеток, вступивших в апоптоз, в интактной культуре моноклеарных лейкоцитов составило 20,13 (13,84-22,09)%, что статистически значимо превышало число апоптотически измененных опухолевых клеток линии Jurkat (4,99 (1,78-6,38) %) и ТНР-1 (11,18 (9,2 -13,5) %) ( $p < 0,05$ ).

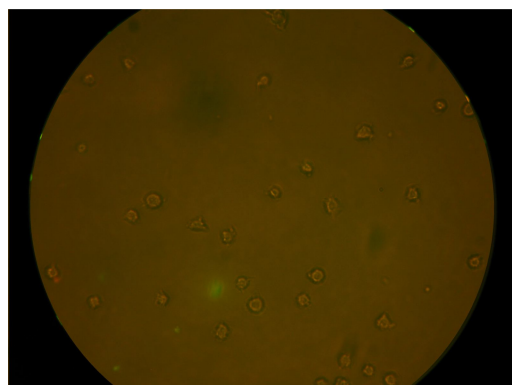
При добавлении в среду инкубации KRIBB3 число апоптотически измененных клеток достоверно увеличивалось в опухолевых культурах линий ТНР-1 и Jurkat до 50,80 (45,60-54,80) и 27,50 (12,98-29,5)% ( $p < 0,05$ ), соответственно, по отношению к интактным клеткам, чего не отмечалось в культуре моноклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров ( $p < 0,05$ ) (рис. 4, 5).





**Рис.4** Количество апоптотически измененных клеток при культивировании с ингибитором белка теплового шока Hsp27 (KRIBB-3) *in vitro*

Примечание: 1 – интактные мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров; 2 – интактная культура опухолевых клеток линии Jurkat; 3 – Ингибирование Hsp27 (культивирование клеток линии Jurkat с 0,1мкМ KRIBB3); 4 – ингибирование Hsp27 (культивирование мононуклеарных лейкоцитов с 0,1мкМ KRIBB3)



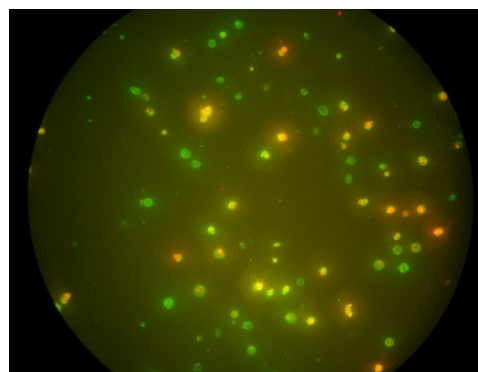
**Интактные клетки линии THP-1**



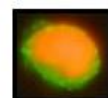
- живые клетки  
(Annexin V-Fitc - /Pi -)



- ранний апоптоз  
(Annexin V-Fitc + /Pi -)



**Культивирование с 0,1 мкМ KRIBB-3**



- поздний апоптоз  
(Annexin V-Fitc + /Pi +)



- некроз  
(Annexin V-Fitc - /Pi +)

**Рис.5** Апоптотически измененные клетки линии THP-1 (флуоресцентная микроскопия, ув. 400)

Добавление в среду культивирования 5 мкМ ингибитора 17-ААГ приводило к увеличению числа клеток линии Jurkat, вступивших в апоптоз, до (23,28 (17,46-26,82)%) ( $p_1 < 0,05$ ) по сравнению с интактной культурой. Аналогичный эффект отмечался при культивировании опухолевых клеток линии ТНР-1 с ингибитором 17-ААГ. Число апоптотически измененных клеток в этом случае достигало 76,70 (73,87-78,82)%, что значительно превышало данный параметр в интактной культуре (11,18 (9,2 -13,5)%, ( $p < 0,001$ )).

Анализ содержания апоптотически измененных клеток в культуре мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, не выявил достоверных различий между интактной культурой и при добавлении ингибиторов белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 *in vitro*.

Разный апоптотический эффект ингибиторов Hsp90 и Hsp27 в исследованных клетках, вероятно, связан с особенностями строения и внутриклеточного содержания данных белков. Так, A. Kamal et al. (2003) показали, что в трансформированных клетках Hsp90 находится в мультишаперонном комплексе с высокой АТФ-азной активностью, который не характерен для нормальных клеток. С другой стороны, в ряде раковых клеток был обнаружен альтернативный вариант сплайсинга Hsp90, в результате которого белок отличается недостаточностью АТФ-связывающего сайта [Zhou V., 2004].

Влияние белков теплового шока на реализацию запрограммированной гибели клеток подтверждалось наличием сильной отрицательной корреляционной связи между уровнем Hsp (Hsp90, Hsp27 - их фосфорилированных и нефосфорилированных форм) и снижением числа апоптотически измененных опухолевых клеток. Так, коэффициент корреляции Спирмена между уровнем Hsp27 и числом апоптотически измененных опухолевых клеток линии Jurkat составил  $r = -0,812$  ( $p < 0,01$ ); для опухолевых клеток линии ТНР-1 –  $r = -0,765$  ( $p < 0,01$ ); между уровнем p-Hsp27 и снижением количества апоптотически измененных клеток  $r = -0,797$ ,  $p < 0,01$  – для опухолевой линии Jurkat,  $r = -0,765$  ( $p < 0,01$ ) – для линии ТНР-1. Сильная отрицательная корреляционная связь также отмечалась между уровнем Hsp90 и числом апоптотически измененных клеток ( $r = -0,807$ ,  $p < 0,01$ ) – в опухолевой культуре линии Jurkat;  $r = -0,821$  ( $p < 0,01$ ) - в опухолевой культуре линии ТНР-1). Стоит отметить, что в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, значимая корреляционная связь отмечалась только между числом апоптотически измененных клеток в культуре и уровнем фосфорилированных форм Hsp27 ( $r = -0,460$ ,  $p < 0,05$ ), а также уровнем Hsp90 ( $r = -0,509$ ,  $p < 0,05$ ).

Полученные результаты свидетельствуют об антиапоптотическом действии Hsp27 и Hsp90 в клетках линии ТНР-1 и Jurkat. В ряде экспериментов выявлена способность Hsp27 связывать Daхх - адаптерный белок альтернативного пути запуска апоптоза через Fas/Apo-1, тем самым препятствуя его выходу из ядра в цитоплазму и активации рецептора FasR [Charette S.J. et al., 2000]. Приводятся также данные о влиянии белка теплового шока 27 на выход таких апоптотических факторов, как цитохром с и Smас [Arya R. et al., 2007].

Внешний путь защиты опухолевых клеток от запуска апоптоза включает

регулирование участников рецептор-опосредованных систем. Известно, что трансформированные клетки могут «слушивать» экстрацеллюлярную часть рецепторов, увеличивая продукцию растворимых форм (sTNF-R1 повышен в сыворотке крови у пациентов с онкологическими заболеваниями) или способны синтезировать неполноценные рецепторы смерти, которые лишены либо имеют неполноценные домены смерти, тем самым защищая себя от запуска апоптоза. К непосредственным участникам внешнего пути регуляции механизмов выживания и программированной клеточной гибели относится система TNF, которая включает цитокин TNF $\alpha$  и рецепторный аппарат TNF-R1 и sTNF-R1. Регуляция данной системы в настоящее время остается до конца не изученной, а имеющиеся результаты весьма противоречивы [Ройт А., Бростофф Дж., 2000].

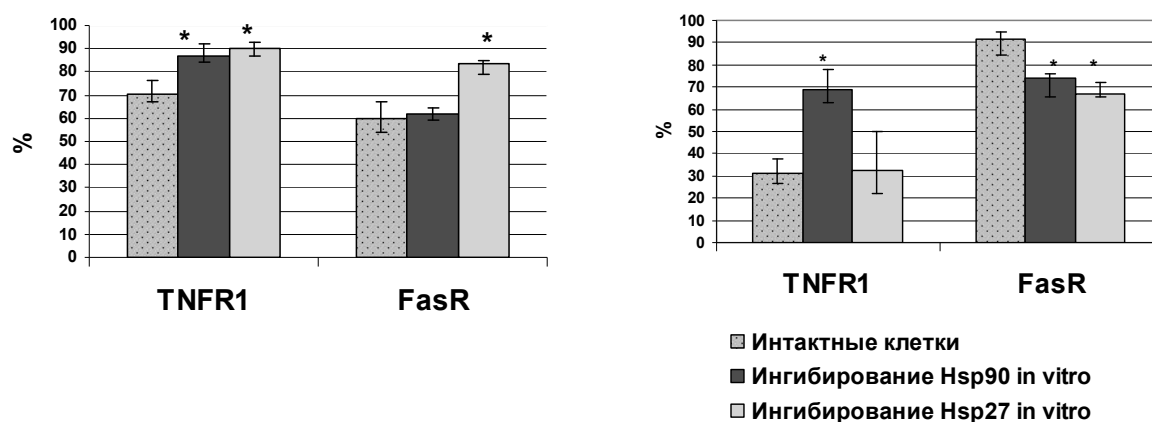
В связи с этим на следующем этапе исследования мы оценивали влияние белков теплового шока на компоненты системы TNF и Fas-рецепторов.

Результаты проточной цитофлуориметрии показали, что при ингибировании Hsp90 в клеточной линии Jurkat отмечалось значительное увеличение процентного содержания клеток, несущих на своей поверхности TNF-R1 (рис. 6). Так, при сравнении с интактными клетками Jurkat данный показатель увеличивался более, чем в 2 раза. Вместе с тем блокирование Hsp27 не вызывало изменений количества клеток, экспрессирующих на своей поверхности TNF-R1.

При добавлении в среду культивирования опухолевой линии ТНР-1 селективных ингибиторов белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 отмечалось достоверное повышение экспрессии TNF-R1 на поверхности клеток по сравнению с культурами интактных клеток (рис. 6). При этом действие ингибиторов Hsp27 и Hsp90 на экспрессию TNF-R1 в опухолевых клетках линии ТНР-1 оказалось в равной степени выраженным.

Ингибирование белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у относительно здоровых доноров, не вызывало изменения количества TNF-R1 на поверхности клеток.

А) Опухолевые клетки линии ТНР-1    Б) Опухолевые клетки линии Jurkat



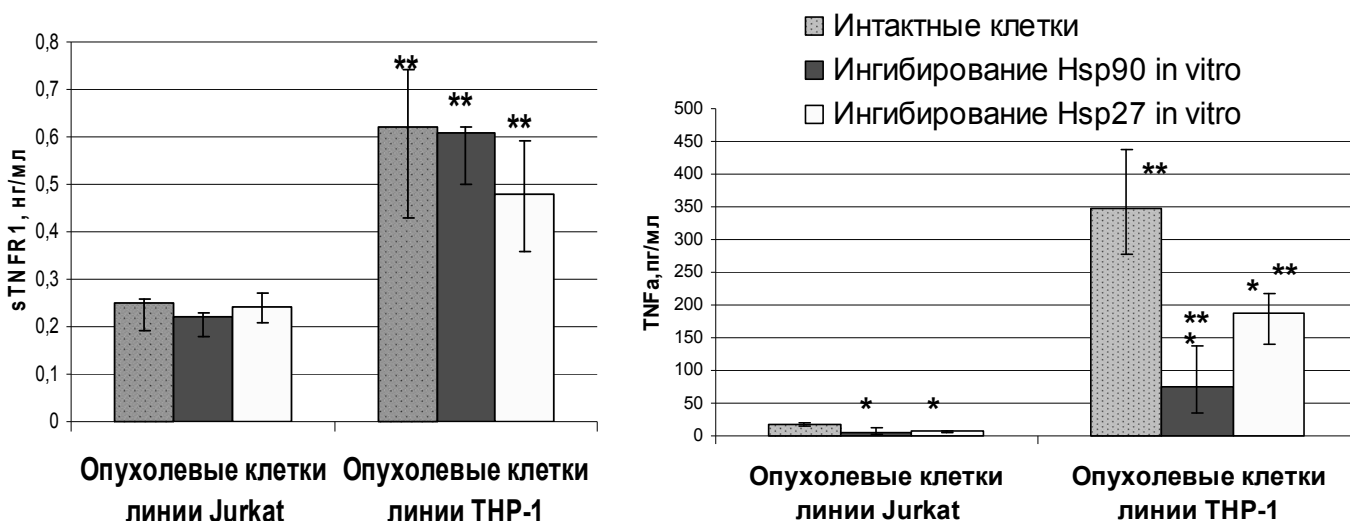
**Рис. 6** Количество TNFR1- и FasR-презентирующих опухолевых клеток линии ТНР-1 (А) и Jurkat (Б) при ингибировании белков теплового шока *in vitro*

Примечание: \* - достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре ( $p < 0,05$ )

Действие ингибитора белка теплового шока Hsp90 на культуру опухолевых клеток линии Jurkat *in vitro* приводило к снижению числа FasL-презентирующих клеток (65,20(61,45-73,00)%), относительно интактной культуры (96,10(93,00-96,85%)) ( $p < 0,01$ ).

В опухолевых клетках линии ТНР-1 действие ингибитора белка теплового шока Hsp90 не приводило к изменениям количества FasR-положительных (рис.6) и FasL-презентирующих клеток (98,60(97,95-99,40%)) относительно интактной культуры. Ингибирование белка теплового шока Hsp27 в опухолевой культуре линии ТНР-1 сопровождалось повышением числа FasR-презентирующих клеток в 1,4 раза ( $p = 0,001$ ) (рис.6) и снижением количества FasL-позитивных клеток ( $p = 0,003$ ) относительно контрольных значений. При ингибировании Hsp27 *in vitro* в опухолевых клетках линии Jurkat отмечалось снижение количества FasR-презентирующих клеток (рис.6). Количество FasL-позитивных клеток линии Jurkat также снижалось относительно данных параметров в интактной культуре ( $p < 0,01$ ).

На рисунке 7 представлены результаты исследования продукции TNF $\alpha$  и sTNFR1 в культурах опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1 при селективном ингибировании Hsp27 и Hsp90 *in vitro*.



**Рис.7** Концентрация sTNFR1 и TNF $\alpha$  в супернатантах культур опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1 при ингибировании белков теплового шока *in vitro*

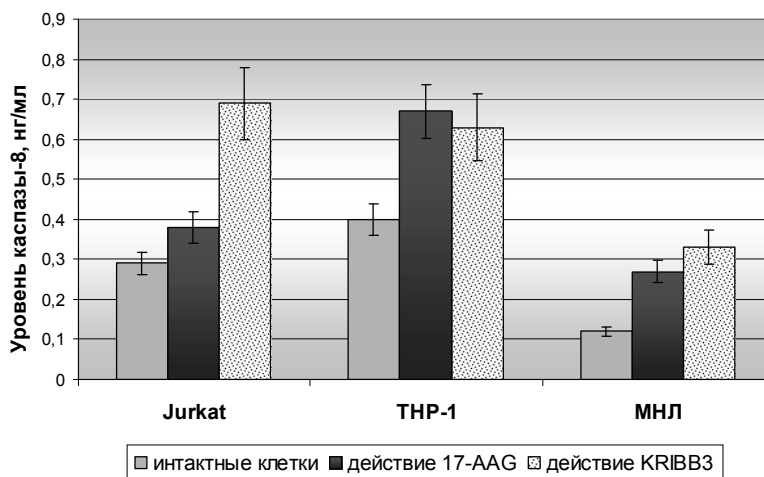
Примечание: \* - достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре; \*\* - по сравнению с аналогичным показателем в культуре опухолевых клеток линии Jurkat ( $p < 0,05$ )

Полученные нами результаты показывают, что белки теплового шока Hsp90 и Hsp27 имеют неоднозначную роль в активации TNF- и Fas-систем опухолевых клеток линий ТНР-1 и Jurkat. Ингибирование данных белков приводит к увеличению количества TNFR1 и FasR, уменьшению содержания их лигандов (TNF $\alpha$ , FasL) в опухолевых клетках линии ТНР-1. В опухолевых клетках Т-лимфобластного лейкоза увеличение количества TNFR1 имеет место только при ингибировании белка теплового шока Hsp90. Количество FasR и

FasL при ингибировании Hsp90 и Hsp27 в данной культуре, напротив, уменьшалось.

Следует отметить, что увеличение количества TNFR1 и FasR на поверхности опухолевых клеток облегчает проведение апоптотического сигнала по рецептор-опосредованному пути. Полученные данные согласуются с увеличением процента клеток, вступивших в апоптоз, при ингибировании Hsp90 и Hsp27 в опухолевых клетках. Важными молекулярными участниками рецептор-опосредованного пути апоптоза являются каспазы. В зависимости от своей структуры и предназначения при передаче сигнала клеточной смерти каспазы делятся на инициаторные и эффекторные [Фильченков А.А., 2003]. Первые (каспаза-2, -8, -9, -10) трансактивируют вторые (каспаза-3, -6, -7, и -14), которые в свою очередь гидролизуют клеточные субстраты [Lavrík I.N. et al., 2005].

Исследования уровня каспазы-8 в клеточных лизатах трансформированных и нетрансформированных клеток методом иммуноферментного анализа показало, что в опухолевых клетках линии Jurkat и ТНР-1 её содержание достоверно выше, чем в мононуклеарных лейкоцитах у здоровых доноров (рис.8). Данные результаты можно объяснить высоким уровнем TNFR1 и Fas-рецептора, а также повышенным белковым синтезом в исследованных опухолевых клетках по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров. Известно, что FADD - домен TNF рецептора - инициирует олигомеризацию каспазы-8, что приводит к образованию активного фермента.



**Рис. 8** Уровень каспазы-8 в опухолевых клетках линии Jurkat, ТНР-1 и в мононуклеарных лейкоцитах (МНЛ) при действии ингибиторов белков теплового шока 90 и 27 *in vitro*

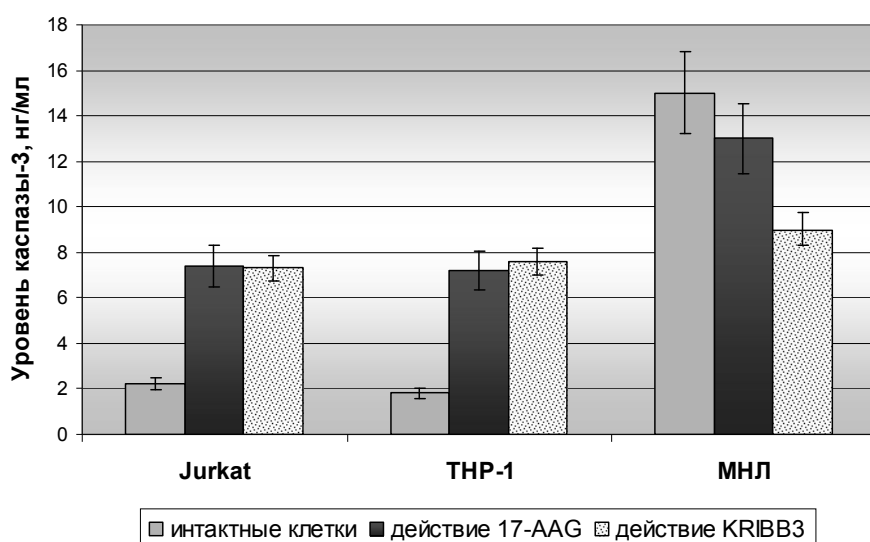
Ингибирование белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 приводило к достоверному увеличению количества активной формы каспазы-8 как в опухолевых клетках, так и в мононуклеарных лейкоцитах здоровых доноров (рис.8).

Исходя из полученных данных, можно заключить, что белки теплового шока Hsp90 и Hsp27 влияют на активацию инициаторной каспазы-8. Можно

предположить, что Hsp90 и Hsp27 регулируют рецепторный путь не только через RIP, Akt, NF-κB, но и напрямую ингибируют превращение прокаспазы-8 в активную форму. Однако в литературе данных о влиянии белков теплового шока на взаимодействие прокаспазы с FADD или на её расщепление в активную форму нами обнаружено не было.

Результаты иммуноферментного анализа показали, что значения уровня каспазы-3 в опухолевых клетках линии Jurkat и ТНР-1 были значимо ниже, чем в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров (рис.9). Это согласуется с приведенными выше данными и подтверждает факт угнетения спонтанного апоптоза опухолевых клеток по сравнению с нетрансформированными клетками.

При действии ингибиторов белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 в опухолевых клетках отмечалось резкое повышение содержания каспазы-3. В мононуклеарных лейкоцитах, взятых у здоровых доноров, действие ингибитора 17-AAG не приводило к значимому изменению содержания каспазы-3. Ингибирование Hsp27 в мононуклеарных лейкоцитах, напротив, вызывало снижение уровня данной каспазы в 1,6 раза относительно контроля (рис.9).



**Рис.9** Уровень каспазы-3 в опухолевых клетках линии Jurkat, ТНР-1 и в мононуклеарных лейкоцитах (МНЛ) при действии ингибиторов белков теплового шока *in vitro*

Поводя итог вышесказанному, можно сделать заключение о том, что белки теплового шока Hsp90 и Hsp27 играют антиапоптотическую роль в клетках Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии. Действие специфических ингибиторов белков теплового шока приводит к увеличению числа апоптотически измененных клеток в опухолевых культурах линий Jurkat и ТНР-1 и не изменяет данный параметр в культуре мононуклеарных лейкоцитов. Молекулярные механизмы запуска запрограммированной гибели опухолевых клеток при ингибировании Hsp90 и Hsp27, кроме активации каспаз -8 и -3, а также систем TNFR1 и FasR, вероятно, включают в себя активацию иных рецепторов суперсемейства фактора некроза опухоли и/или других путей

регуляции апоптоза, что стало предметом нашего исследования на следующем этапе.

### **3. Роль белков теплового шока 90 и 27 кДа в регуляции митохондриального пути апоптоза**

Для оценки роли белков теплового шока в регуляции митохондриального пути индукции апоптоза в настоящей работе был исследован ряд показателей, характеризующий его реализацию (уровень трансмембранного потенциала митохондрий, содержание белков семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bax, Bad) в условиях действия специфических ингибиторов Hsp90 и Hsp27 *in vitro*.

Определение числа клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий, выполненное с помощью метода проточной лазерной цитометрии, показало, что в культурах клеток линии Jurkat и ТНР-1, а также в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, количество клеток со сниженным  $\Delta\psi_m$  составило  $10,62\pm 4,76$ ;  $9,80\pm 2,32$  и  $8,08\pm 3,51\%$ , соответственно.

Добавление в культуральную среду специфических ингибиторов белков теплового шока KRIBB-3 и 17-AAG увеличивало процент клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий во всех исследованных культурах клеток (линии Jurkat и ТНР1, мононуклеарные лейкоциты) (рис.10).

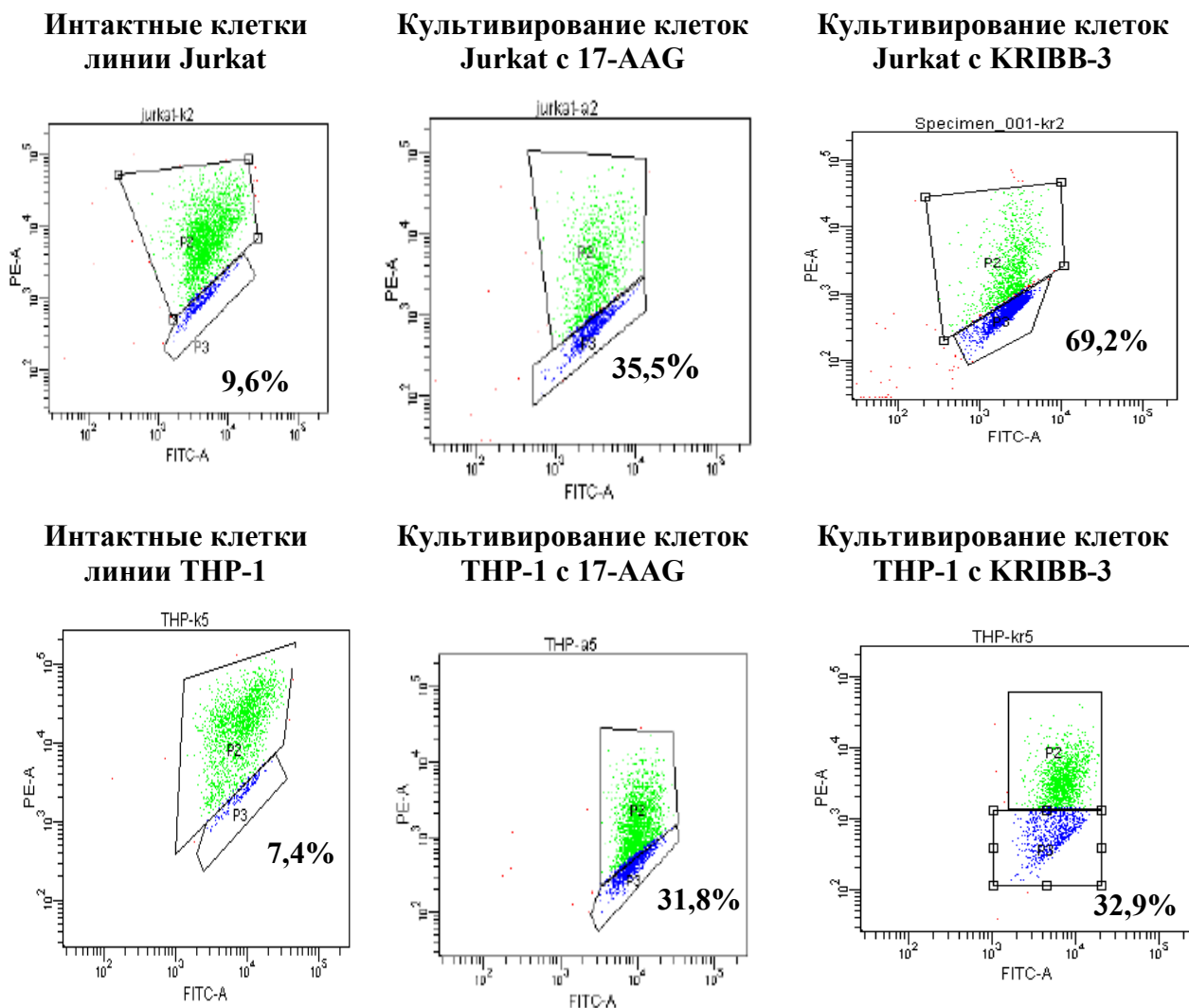
Так, добавление ингибиторов Hsp27 и Hsp90 в культуральную среду приводило к достоверному увеличению числа клеток со сниженным  $\Delta\psi_m$  в культуре моноцитарной лейкемии ( $31,40\pm 6,08$  и  $26,98\pm 5,53$  %, соответственно) по сравнению с интактными клетками. Действие ингибитора Hsp27 в опухолевой линии Jurkat повышало уровень клеток с деполяризованной мембраной митохондрий в 6,5 раз, по сравнению с интактной культурой, достигая значений  $65,94\pm 6,98$  % ( $p<0,001$ ). Количество клеток со сниженным  $\Delta\psi_m$  при ингибировании Hsp90 *in vitro* в клеточной культуре линии Jurkat достигало  $40,76\pm 6,14$  %, что в 4,5 раза превышало данный параметр в контроле.

Белки семейства Bcl-2 являются молекулами, интегрирующими сигналы различных индукторов клеточной гибели и определяющими высвобождение митохондриальных факторов развития запрограммированной клеточной гибели в зависимости от преобладающего действия проапоптотических или антиапоптотических белков семейства Bcl-2.

В связи с этим мы оценивали содержание антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотических белков Bax и Bad в опухолевых и нетрансформированных интактных клетках, а также в условиях специфического ингибирования белков теплового шока *in vitro*. В результате исследования был установлен факт высокого содержания Bcl-2 и снижения количества Bax в клетках Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии, по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров (табл. 2,3).

Механизмы, приводящие к увеличению содержания Bcl-2 при Т-лимфобластном лейкозе и моноцитарной лейкемии, могут быть основаны на способности активной формы Hsp27 индуцировать транскрипционный фактор

NF-κB, который, в свою очередь, стимулирует экспрессию антиапоптотических белков (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> и c-IAPs) [Concannon C.G. et al., 2003]. Снижение содержания белка Вах также может быть связано с повышенной экспрессией Hsp27 в опухолевых клетках, так как данный шаперон, по мнению A. Navasi et al. [2008], усиливает активность протеинкиназы В, которая, фосфорилируя белок Вах, подавляет его проапоптотическую функцию.



**Рис. 10** Количество клеток линий Jurkat и ТНР-1 со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий в условиях действия ингибиторов белков теплового шока *in vitro* (по данным проточной лазерной цитометрии)

Примечание: P2 – гейт клеток с поляризованной мембраной митохондрий; P3 - гейт клеток с деполяризованной мембраной митохондрий; 17-AAG – ингибитор Hsp90; KRIBB-3 – ингибитор Hsp27.

Исследование показало, что при добавлении ингибитора белка теплового шока Hsp27 содержание белка Bcl-2 в опухолевых клетках линии Jurkat значительно уменьшалось, а белка Вах – повышалось, по сравнению с интактной культурой (табл. 2, 3).



Таблица 2

**Внутриклеточное содержание белка Vcl-2 (усл.ед.) в клетках линий Jurkat, ТНР-1 и в мононуклеарных лейкоцитах в условиях ингибирования белков теплового шока in vitro (Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))**

| Тип клеток / Условия культивирования    | Опухолевые клетки линии Jurkat (I)                                  | Опухолевые клетки линии ТНР-1 (II)                                  | Мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров (III) | Рмежгрупповая  |
|---|---|---|---|--|
| <b>Интактные клетки</b>                 | 4,22<br>(3,83-4,46)   | 5,67<br>(4,90 -6,44)  | 2,03<br>(1,71-2,13)                             | P <sub>I-II</sub> <0,05<br>P <sub>I-III</sub> <0,05<br>P <sub>II-III</sub> <0,05 |
| <b>Культивирование с 5 мкМ 17-ААГ</b>   | 4,51<br>(3,80-5,10)<br>p <sub>1</sub> >0,05                         | 4,81<br>(4,69-5,52)<br>P <sub>1</sub> >0,05                         | 3,11<br>(2,49-5,85)<br>p <sub>1</sub> <0,05     | P <sub>I-II</sub> >0,05<br>P <sub>I-III</sub> >0,05<br>P <sub>II-III</sub> >0,05 |
| <b>Культивирование с 0,1 мкМ КRIBB3</b> | 2,67<br>(2,31-2,97)<br>p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>2</sub> <0,05 | 6,32<br>(4,29-8,35)<br>p <sub>1</sub> >0,05<br>p <sub>2</sub> >0,05 | 0,00  | P <sub>I-II</sub> <0,05<br>P <sub>I-III</sub> <0,05<br>P <sub>II-III</sub> <0,05 |

**Примечание:** здесь и в табл. 3, 4 p<sub>1</sub> – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями в интактной культуре; p<sub>2</sub> – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями в культуре при культивировании с 17-ААГ.

Таблица 3

**Внутриклеточное содержание белка Вах (усл.ед.) в клетках линий Jurkat, ТНР-1 и в мононуклеарных лейкоцитах в условиях ингибирования белков теплового шока in vitro (Ме(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))**

| Тип клеток / Условия культивирования    | Опухолевые клетки линии Jurkat (I)                                    | Опухолевые клетки линии ТНР-1 (II)                                  | Мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров (III)                     | Рмежгрупповая  |
|---|---|---|---|--|
| <b>Интактные клетки</b>                 | 7,31<br>(7,14-8,90)   | 3,74<br>(1,84-3,85)   | 14,39<br>(11,79-16,99)  | P <sub>I-II</sub> <0,05<br>P <sub>I-III</sub> <0,05<br>P <sub>II-III</sub> <0,05 |
| <b>Культивирование с 5 мкМ 17-ААГ</b>   | 1,85<br>(1,71-1,99)<br>p <sub>1</sub> <0,05                           | 2,20<br>(1,87-2,34)<br>p <sub>1</sub> >0,05                         | 2,74<br>(2,52-2,96)<br>p <sub>1</sub> <0,05                         | P <sub>I-II</sub> >0,05<br>P <sub>I-III</sub> <0,05<br>P <sub>II-III</sub> <0,05 |
| <b>Культивирование с 0,1 мкМ КRIBB3</b> | 10,07<br>(9,16-11,23)<br>p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>2</sub> <0,05 | 2,21<br>(1,65-2,77)<br>p <sub>1</sub> >0,05<br>p <sub>2</sub> >0,05 | 2,36<br>(2,26-2,80)<br>p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>2</sub> >0,05 | P <sub>I-II</sub> <0,05<br>P <sub>I-III</sub> <0,05<br>P <sub>II-III</sub> >0,05 |

После инкубации опухолевых клеток линии ТНР-1 с KRIBB3 уровень белков Bcl-2 и Вах значимо не изменялся, однако отмечалось двукратное увеличение содержания белка Bad, по сравнению с интактной культурой. Стоит отметить, что в культуре мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, действие ингибитора Hsp27 приводило к снижению уровня Вах в 6 раз, по отношению к контролю, и исчезновению белков Bcl-2 и Bad (табл. 2-4).

Ингибирование Hsp90 *in vitro* в опухолевых клетках линии Jurkat и ТНР-1 не приводило к изменению количества белка Bcl-2, но при этом повышало уровень проапоптотического белка Bad более, чем в 2 раза в культуре ТНР-1, по отношению к интактным клеткам данной линии (табл. 2, 4). Культивирование опухолевых клеток с 5 мкМ 17-ААГ сопровождалось снижением уровня Вах в 3,9 раза в культуре Jurkat и отсутствием изменений данного параметра в культуре ТНР-1 по отношению к контролю. В мононуклеарных лейкоцитах действие ингибитора Hsp90 приводило к увеличению содержания антиапоптотического белка Bcl-2 (в 1,5 раза) и снижению содержания проапоптотического белка Вах (в 5,3 раз) по отношению к контролю. Данный эффект ингибитора 17-ААГ на белки семейства Bcl-2 объясняет отсутствие его проапоптотического действия в клетках здоровых доноров.

В опухолевых клетках линии ТНР-1 в условиях ингибирования Hsp27 апоптоз, возможно, реализуется по Вах-независимому механизму, так как происходит нейтрализация его апоптотического действия молекулами Bcl-2.

Таблица 4

**Внутриклеточное содержание белка Bad (усл.ед.) в клетках линий Jurkat, ТНР-1 и в мононуклеарных лейкоцитах в условиях ингибирования белков теплового шока *in vitro* (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))**

| Тип клеток<br>Условия культивирования | Опухолевые клетки линии Jurkat (I)                                  | Опухолевые клетки линии ТНР-1 (II)                                  | Мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров (III) | Рмежгрупповая  |
|---------------------------------------|---|---|---|--|
| Интактные клетки                      | 3,01<br>(2,73-3,23)   | 2,78<br>(2,51 -3,05)  | 1,67<br>(0,86-1,95)                             | P <sub>I-II</sub> >0,05<br>P <sub>I-III</sub> <0,05<br>P <sub>II-III</sub> <0,05 |
| Культивирование с 5 мкМ 17-ААГ        | 3,60<br>(3,22-4,12)<br>p <sub>1</sub> >0,05                         | 6,08<br>(5,35 - 7,55)<br>p <sub>1</sub> <0,05                       | 6,51<br>(5,01-8,43)<br>p <sub>1</sub> <0,05     | P <sub>I-II</sub> <0,05<br>P <sub>I-III</sub> <0,05<br>P <sub>II-III</sub> >0,05 |
| Культивирование с 0,1 мкМ KRIBB3      | 3,36<br>(2,24-3,53)<br>p <sub>1</sub> >0,05<br>p <sub>2</sub> >0,05 | 4,65<br>(3,87-5,43)<br>p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>2</sub> <0,05 | 0,00  | P <sub>I-II</sub> <0,05<br>P <sub>I-III</sub> <0,05<br>P <sub>II-III</sub> <0,05 |

Следует добавить, что существуют противоположные данные о влиянии KRIBB3 на Вах. Так, Ki D. Shin et al. [2008] в работах на клетках HCT-116 (human colon cancer cell line), HCA-7 (human breast cancer cell line) и SK-OV-3 (human ovarian cancer cell line) описали Вах-опосредованное проапоптотическое

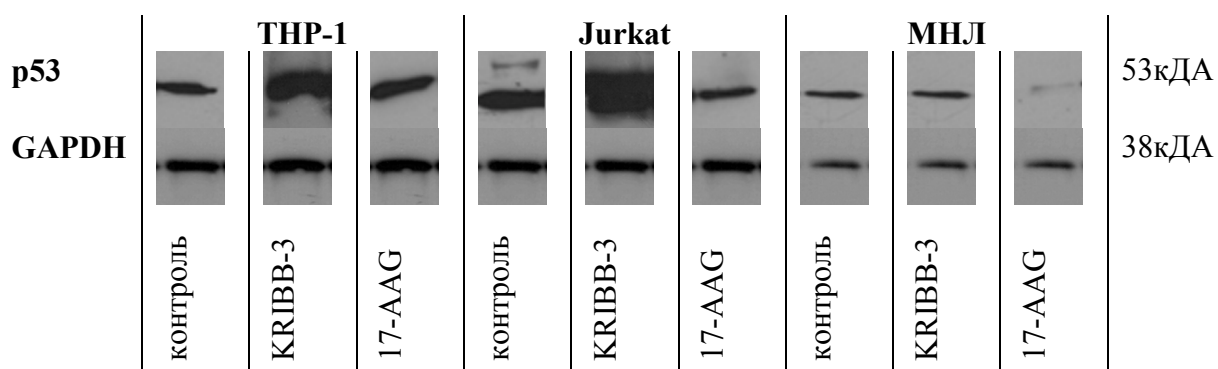
действие KRIBB3. А. Navasi et al. [2008] доказали PI3K-Akt-опосредованное ингибирующее действие Hsp27 на Вах в опухолевых клетках линии НК-2.

При добавлении KRIBB3 в культуру опухолевых клеток ТНР-1 может происходить активация NF-κВ, что способствует выживанию клетки путем повышения экспрессии антиапоптотических факторов, в том числе Bcl-2 и Bcl-X<sub>L</sub>, а также снижения транскрипции проапоптотических генов. Однако стоит заметить, что роль транскрипционного фактора NF-κВ в реализации апоптоза неоднозначна и в ряде исследований обнаружено, что активация NF-κВ может сенсibiliзировать клетки к апоптозу [Новицкий В.В. и соавт., 2009; Рязанцева Н.В. и соавт., 2009; Часовских Н.Ю. и соавт., 2009]. Так, К.М. Ryan et al. [2000] в ходе своих исследований обнаружили, что ингибирование или потеря активности NF-κВ блокирует p53-опосредованный апоптоз.

#### 4. Молекулярные основы взаимоотношения белков теплового шока 90 и 27 кДа и фактора транскрипции p53

Ключевым транскрипционным фактором, вовлеченным в реализацию апоптоза, является p53. Данный белок активируется в ответ на различные формы клеточного стресса и необходим для управления антипролиферативными процессами. p53 может быть индуцирован повреждением ДНК, гипоксией или сбившейся экспрессией онкогенов. Этот белок регулирует репарацию ДНК, клеточное старение и апоптоз [Levine A. J. 1997; Hofseth L. J. et al., 2004; Lin M. et al., 2004]. Мутированный или деактивированный p53 выявляется в более, чем в 50% опухолей человека [Milner J. et al., 1991; Kern S. E. et al., 1992].

В опухолевой линии Jurkat белок p53 представлен в форме дикого типа и мутантной [Schavinsky-Khrapunsky Y., et al., 2003]. Проведенные нами исследования с использованием вестерн-блоттинга также выявили наличие двух бандов белка p53 в лизатах опухолевых клеток линии Jurkat, что соответствует наличию как мутантной формы p53, так и дикого типа (рис. 11).

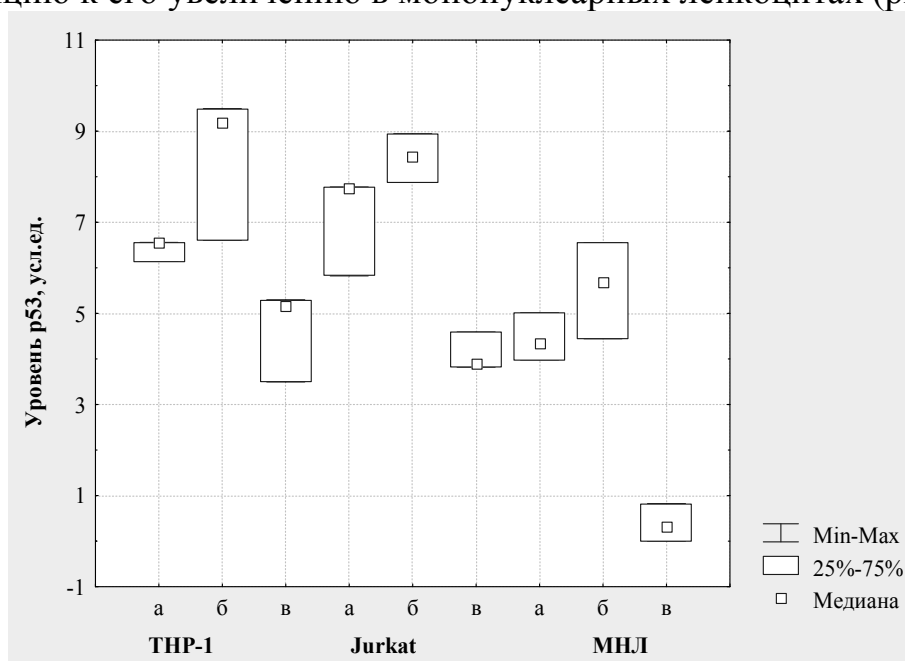


**Рис.11** Идентификация белка P53 в опухолевых клетках линий ТНР-1, Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах (МНЛ) при действии ингибиторов белков теплового шока *in vitro* (по данным вестерн-блоттинга)

Примечание (здесь и на рис.17, 18): GAPDH-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

Проведенный вестерн-блотт анализ выявил разнонаправленные эффекты воздействия ингибиторов белков теплового шока на внутриклеточный уровень апоптогенного фактора p53. Так, в опухолевых клетках линии Jurkat и ТНР-1 при ингибировании Hsp90 *in vitro* количество p53 было значимо ниже контроля в 1,7 и 1,4 раза, соответственно (рис.12). Интересно, что при этом в блотте опухолевых клеток линии Jurkat не выявлялась мутантная форма p53, а в мононуклеарных лейкоцитах уровень p53 дикого типа падал практически до нуля (рис.12). Полученные результаты говорят о том, что молекулярный шаперон Hsp90 играет важную роль в защите от деградации белка p53 как мутантного, так и дикого типа.

Исследование общего уровня p53 при ингибировании Hsp27 *in vitro* в трансформированных и нетрансформированных клетках выявило достоверное увеличение данного параметра в опухолевых клетках линии Jurkat и ТНР-1, а также тенденцию к его увеличению в мононуклеарных лейкоцитах (рис.12).



**Рис. 12** Содержание белка P53 в опухолевых клетках линии ТНР-1, Jurkat и мононуклеарных лейкоцитах (МНЛ) при действии ингибиторов Hsp27 и Hsp90 *in vitro* (по данным вестерн-блотт анализа)

Примечание: **а** - интактная культура; **б** - действие 0,1μМ KRIBB-3; **в**- действие 5μМ 17-AAG

Показано, что блокирование HSF-1 и уменьшение внутриклеточного уровня Hsp27 является триггером для накопления транскрипционно активного мутанта p53 [Kanagasabai R. et al., 2011]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что шаперон Hsp27 регулирует транскрипционную активность p53. Также в пользу данного факта в литературе имеются данные, показывающие, что Hsp27 ослабляет доксорубицин-индуцированный апоптоз фибробластов и кардиомиоцитов, уменьшая транскрипционную активность p53 и увеличивая активность p21 [Venkatakrishnan C.D. et al., 2008].

На наш взгляд, молекулярные шапероны Hsp90 и Hsp27 необходимы для обеспечения стабильности и регуляции транскрипционной активности p53 и представляют собой дополнительный уровень управления данного транскрипционного фактора.

### 5. Роль белков теплового шока в регуляции NF-κB сигнального пути

Одним из важных факторов транскрипции, участвующих в регуляции апоптоза, а также пролиферации и выживания клеток, является NF-κB. Полифункциональный транскрипционный фактор NF-κB представляет собой семейство цитоплазматических белков, к которым относятся: p50/105 (NF-κB1), p52/100 (NF-κB2)1, p65 (RelA), c-Rel и RelB. Несмотря на множество форм, классическим типом NF-κB является гетеродимер p50-p65 [Маянский А.Н. и соавт., 2007; Рязанцева Н.В. и соавт., 2009].

Оценка уровня транскрипционного фактора NF-κB в лизатах опухолевых клеток линии Jurkat и ТНР-1, а также в мононуклеарных лейкоцитах с помощью вестерн-блоттинга не выявила достоверных различий. Ингибирование белка теплового шока Hsp90 сопровождалось увеличением содержания активной формы субъединицы NF-κB p65 (RelA) в опухолевых клетках линии Jurkat и ТНР-1 (в 1,7 и 1,9 раза, соответственно) относительно интактных культур и отсутствием значимых изменений данного параметра в мононуклеарных лейкоцитах, выделенных у относительно здоровых доноров (табл.5).

Таблица 5

**Содержание транскрипционного фактора NF-κB в лизатах опухолевых клеток линий Jurkat, ТНР-1 и мононуклеарных лейкоцитах в условиях ингибирования белков теплового шока 90 и 27 кДа *in vitro* (усл.ед.) (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))**

| Условия культивирования / Клетки       | Опухолевые клетки линии Jurkat (I)                     | Опухолевые клетки линии ТНР-1 (II)                      | Мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров (III)       | $P_{пар}$ ( $p < 0,02$ )                                    |
|--|--|---|---|---|
| Интактные клетки (1)                   | 1,59<br>(1,32-1,86)                                    | 1,31<br>(1,15-1,58)                                     | 1,52<br>(1,33-2,09)                                   | $p_{I-II}=0,106$<br>$p_{I-III}=0,746$<br>$p_{II-III}=0,106$ |
| Культивирование с 17-AAG (5 мкМ) (2)   | 2,67<br>(2,24-3,10)                                    | 2,52<br>(2,01-3,15)                                     | 2,14<br>(1,43-2,67)                                   | $p_{I-II}=1,000$<br>$p_{I-III}=0,152$<br>$p_{II-III}=0,317$ |
| Культивирование с KRIBB3 (0,1 мкМ) (3) | 2,48<br>(2,23-2,73)                                    | 4,81<br>(2,52-5,43)                                     | 0,00  | $p_{I-II}=0,023$<br>$p_{I-III}=0,001$<br>$p_{II-III}=0,001$ |
| $P_{пар}$ ( $p < 0,02$ )               | $p_{1-2}=0,0001$<br>$p_{1-3}=0,003$<br>$p_{2-3}=1,000$ | $p_{1-2}=0,0036$<br>$p_{1-3}=0,0036$<br>$p_{2-3}=0,023$ | $p_{1-2}=0,298$<br>$p_{1-3}=0,002$<br>$p_{2-3}=0,001$ |   |

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что молекулярный шаперон Hsp90 блокирует активацию NF-κB в исследованных опухолевых клетках и не оказывает такого эффекта в мононуклеарных лейкоцитах, взятых у здоровых доноров. В пользу данного положения говорят результаты

исследования ряда других авторов. Так, показано, что термическое воздействие ведет к увеличению содержания Hsp в клетке и блокированию NF-kB-сигнального пути [Pittet J.F. et al. 2005; Salminen A. et al., 2008], причем, ослабление активации NF-kB зависит от силы и времени теплового шока [Schell M.T. et al., 2005]. Молекулярные механизмы регуляции активности NF-kB белком теплового шока Hsp90 еще до конца не изучены. Предполагается, что Hsp90 ослабляет активацию NF-kB, препятствуя деградации I $\kappa$ B. Показано, что Hsp90 является компонентом ИКК комплекса, который представляет собой основной активатор NF-kB [Chen G.P. et al., 2002; Field N. et al., 2003].

Выявлено, что Hsp90 может регулировать чувствительность ИКК к посттрансляционным модификациям и, даже, изменять активность ферментов [Salminen A. et al., 2008]. Hsp90 обладает способностью привести к диссоциации ИКК комплекса на протеинкиназы ИКК $\alpha$ , ИКК $\beta$  и регуляторную единицу NEMO, что подавляет активацию NF-kB-сигнального пути [Pittet J.F. et al., 2005; Salminen A. et al., 2008].

Исследование влияния шаперона Hsp27 на активацию NF-kB-сигнального пути показало, что действие ингибитора KRIBB-3 в концентрации 1 мкМ приводило к значимому увеличению количества фактора транскрипции NF-kB (в частности, его активной субъединицы p65 (RelA)) в опухолевых клетках линии Jurkat в 1,6 раза и в линии ТНР-1 - в 3,7 раз, соответственно, относительно интактных культур (табл.5). Стоит отметить, что ингибирование шаперона Hsp27 в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, сопровождалось отсутствием содержания активной формы субъединицы NF-kB p65 (табл.5). Это указывает на различные механизмы регуляции NF-kB молекулярным шапероном Hsp27 в злокачественных и нетрансформированных клетках.

Следует отметить, что ингибирование Hsp90 и Hsp27 *in vitro* в опухолевых клетках линии Jurkat и ТНР-1 сопровождалось повышением уровня NF-kB на фоне увеличения количества TNFR1 и FasR, а также апоптотически измененных клеток. Можно предположить, что в данных условиях NF-kB оказывает преимущественно проапоптотическое действие. Ингибирование шаперона Hsp27 в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров, сопровождалось, наоборот, резким снижением экспрессии NF-kB на фоне отсутствия значимых изменений в запуске апоптотической программы.

Таким образом, несмотря на накопленный к настоящему времени обширный фактический материал о роли NF-kB в жизнедеятельности клетки, существуют значительные пробелы в оценке исходов активации данного транскрипционного фактора в зависимости от природы индуцирующего сигнала и сопутствующих условий стимуляции.

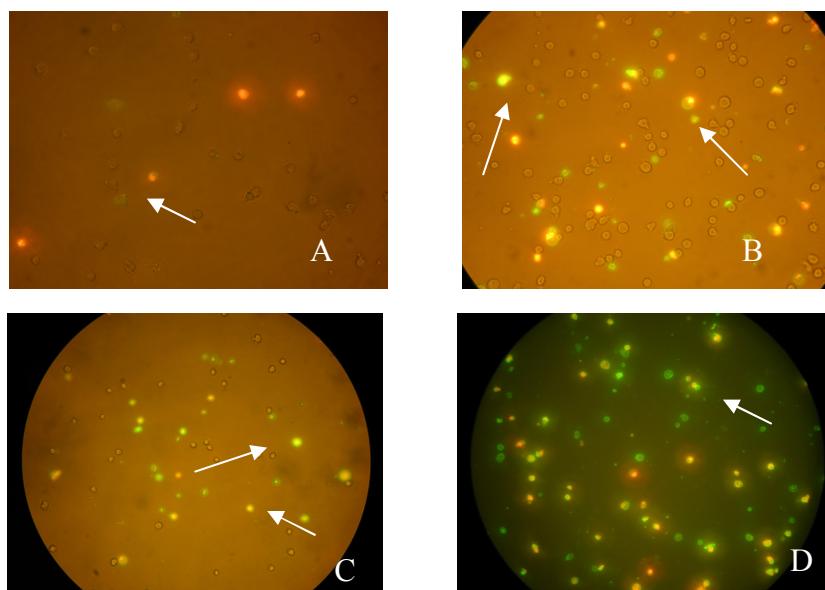
Эксперименты, проведенные в нашей лаборатории, показали, что белки теплового шока Hsp90 и Hsp27 ингибируют активацию NF-kB-сигнального пути в опухолевых клетках линии Jurkat и ТНР-1.

## 6. Молекулярные механизмы дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток в условиях селективного ингибирования Hsp90 и Hsp27 *in vitro*

На следующем этапе нашего исследования была предпринята оценка специфических действий ингибиторов белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 совместно с классическими индукторами апоптоза (rTNF $\alpha$ , дексаметазон) и цитостатиком (этопозид), действующих на различные пути реализации программированной клеточной гибели.

В качестве индуктора апоптоза, преимущественно действующего по рецептор-опосредованному пути, использовали рекомбинантный TNF $\alpha$  (rTNF $\alpha$ ) человека в концентрациях 1, 5, 10 и 30 нг/мл. Наибольшее количество апоптотически измененных клеток линии Jurkat и наименьшее число клеток в состоянии некроза отмечалось при концентрации rTNF $\alpha$  30 нг/мл. В связи с этим при проведении дальнейших экспериментов данная концентрация rTNF $\alpha$  была использована как апоптозиндуцирующая.

Наиболее значимое увеличение значений числа апоптотически измененных клеток линии Jurkat отмечалось при добавлении в среду инкубации rTNF $\alpha$  и ингибитора 17-AAG (рис.13).

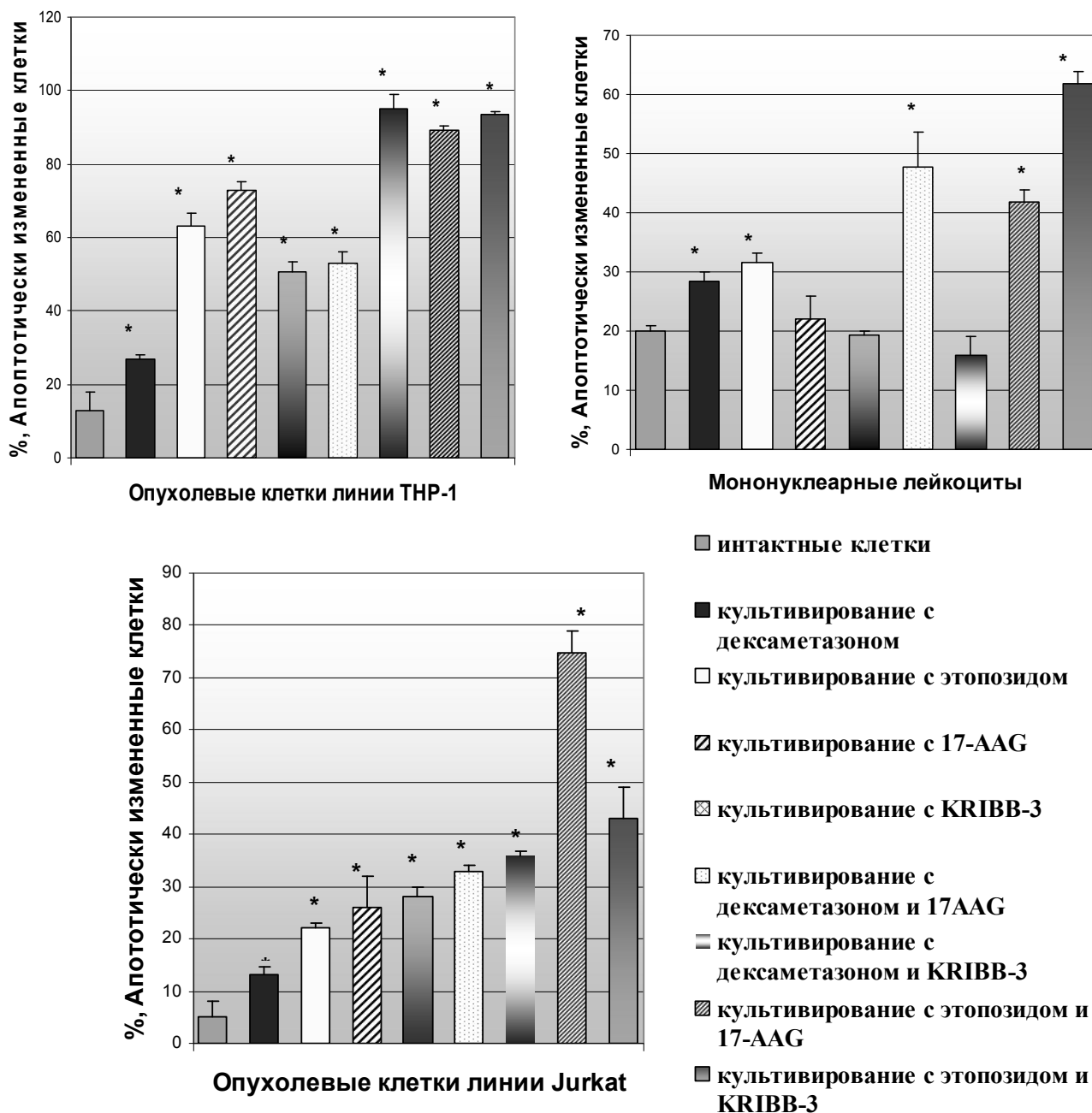


**Рис.13** Апоптотически измененные клетки линии Jurkat (по данным флуоресцентной микроскопии, объектив 40, окуляр 10): **А)** интактная культура линии Jurkat; **В)** клетки при добавлении r-TNF $\alpha$ ; **С)** клетки при добавлении 17-AAG; **Д)** клетки при совместном действии r-TNF $\alpha$  и 17-AAG

Было выявлено, что действие ингибитора Hsp90 повышает активность каспазы-8 в опухолевых клетках линии Jurkat до 1,00 (0,98-1,30) усл.ед по сравнению с интактными клетками (0,53 (0,46-0,58) усл.ед.). При этом эффект 17-AAG на данную каспазу не отличался от эффекта r-TNF $\alpha$ . Совместное действие r-TNF $\alpha$  и 17-AAG увеличивает активность инициаторной каспазы в такой же степени (0,95 (0,87-1,14)) усл.ед., как при действии одного из факторов. Исходя из полученных данных, можно заключить, что белок Hsp90 влияет на активацию инициаторной каспазы-8. Высказано предположение, что Hsp90

регулирует рецепторный путь реализации апоптоза не только через RIP, Akt и NF-κB [Arya R. et al., 2007], но и напрямую, ингибируя превращение прокаспазы-8 в активную форму.

Эксперименты, поведенные в нашей лаборатории, показали, что ингибиторы 17-AAG и KRIBB-3 повышают проапоптотические эффекты rTNFα, этопозида и дексаметазона (рис.13, 14).

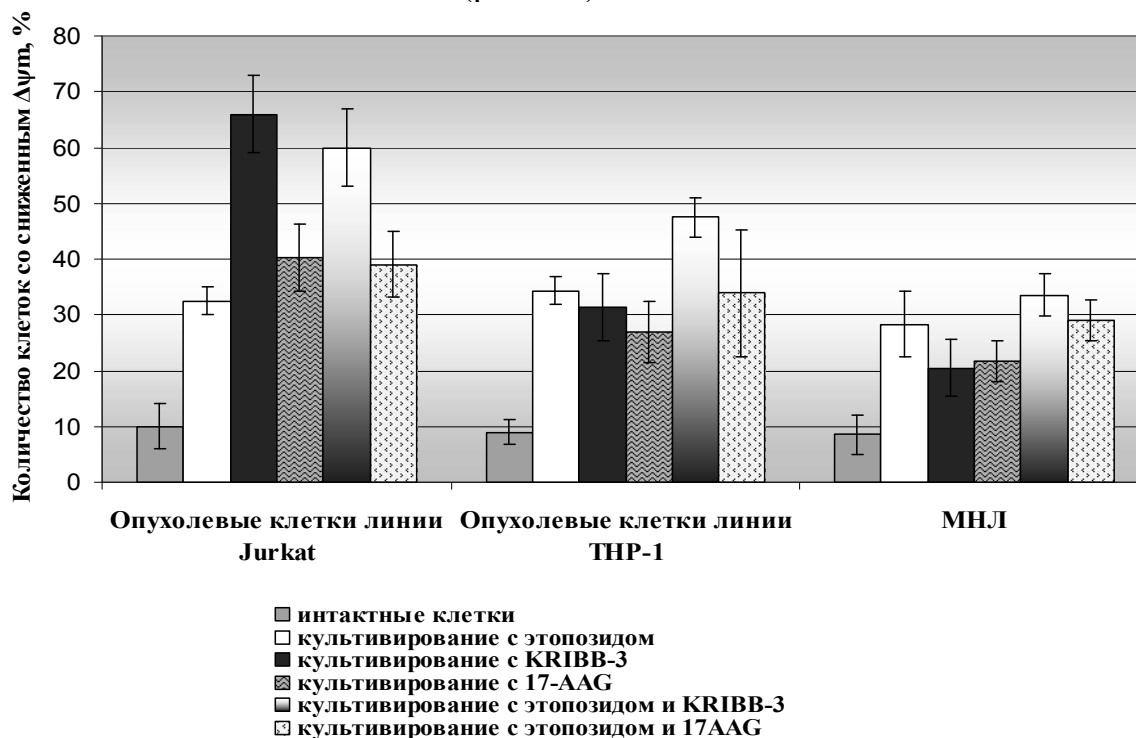


**Рис.14** Уровень апоптотически измененных клеток при действии различных индукторов апоптоза и ингибиторов белков теплового шока *in vitro*  
 Примечание: \* - достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре ( $p < 0,05$ )

Было установлено, что в опухолевых клетках линии Jurkat при совместном действии этопозида и ингибитора Hsp90 значения количества клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий уменьшались в 1,5



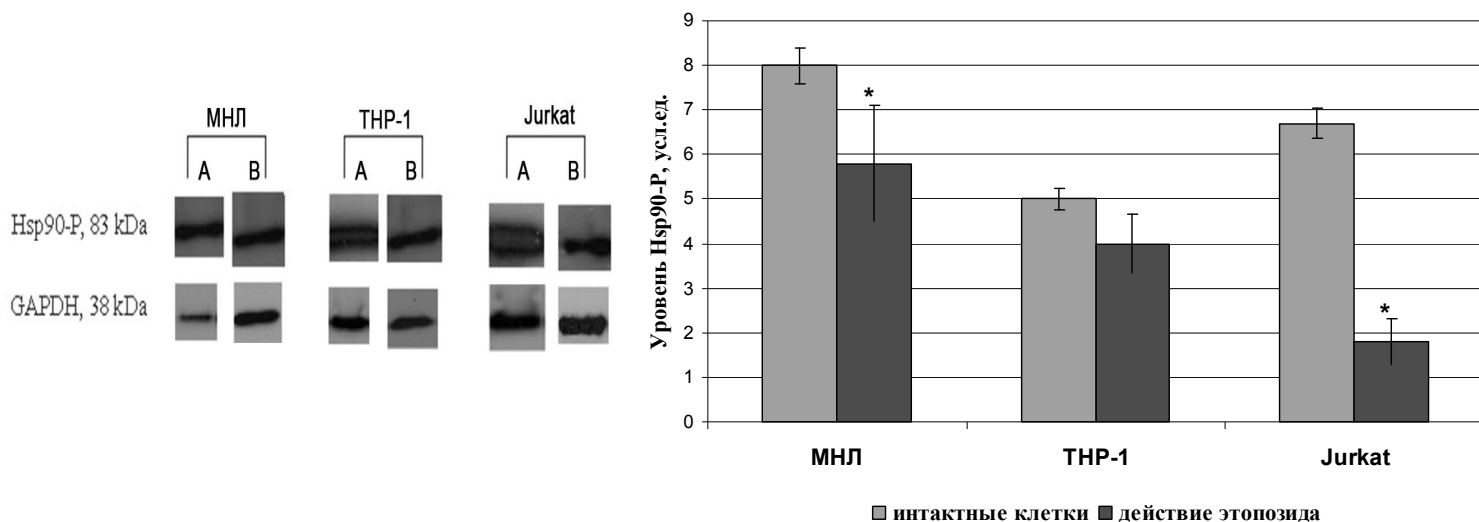
раза по сравнению с аналогичным показателем в клетках, культивированных с этопозидом и ингибитором Hsp27 одновременно ( $p=0,00043$ ). Анализ полученных нами данных также показал, что культивирование Т-лимфобластных клеток с KRIBB3, 17-AAG или KRIBB3 вместе с этопозидом приводит к достоверному увеличению количества клеток со сниженным  $\Delta\Psi_m$  ( $65,94\pm6,9$ ;  $40,76\pm6,14$  и  $58,40\pm7,09\%$ , соответственно;  $p<0,05$ ), по сравнению с аналогичными показателями в культуре мононуклеарных лейкоцитов и опухолевых клеток линии ТНР-1 (рис. 15).



**Рис. 15** Количество клеток линий Jurkat, ТНР-1 и мононуклеарных лейкоцитов (МНЛ) со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий ( $\Delta\Psi_m$ ) при действии этопозида и ингибиторов белков теплового шока *in vitro*

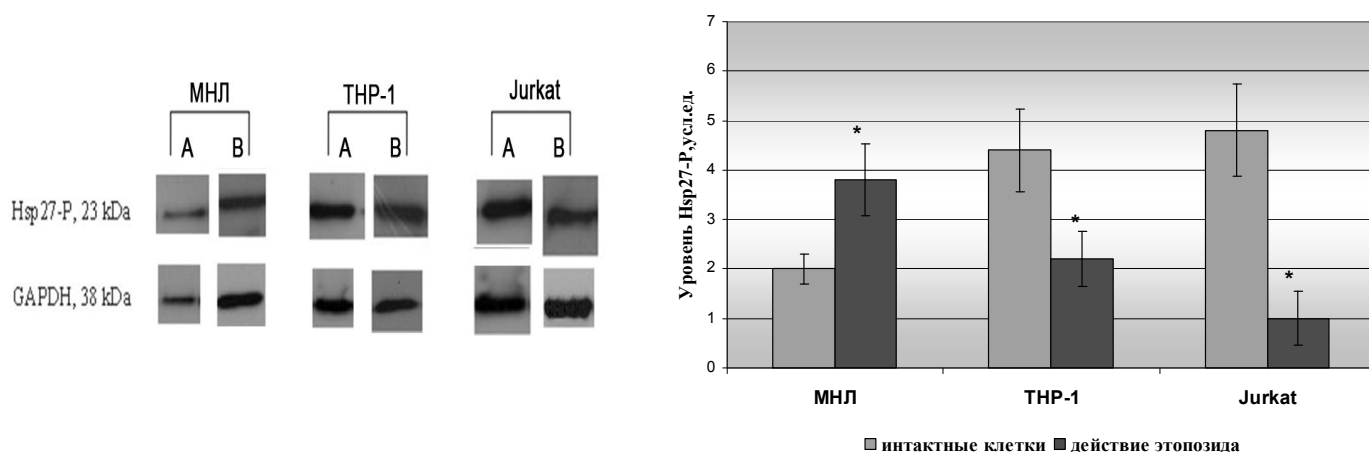
При действии этопозида фиксировали достоверное снижение значений содержания фосфорилированной формы Hsp90 в опухолевых клетках линии Jurkat ( $1,59\pm0,52$  усл. ед.,  $p<0,001$ ) и в мононуклеарных лейкоцитах ( $5,73\pm1,30$  усл. ед.,  $p<0,001$ ), по сравнению с величинами аналогичного показателя в интактных клетках. Напротив, внутриклеточное содержание Hsp90-P в клетках линии ТНР-1 при культивировании с этопозидом не изменялось. При инкубировании опухолевых клеток линии Jurkat с этопозидом было обнаружено минимальное количество Hsp90-P (рис.16).

Интересно заметить, что снижение уровня фосфорилированных форм Hsp90 в опухолевых клетках при действии этопозида ассоциировано с повышением числа апоптотически измененных клеток. Так, совместное действие этопозида и ингибитора Hsp90 приводило к максимальному увеличению числа апоптотически измененных опухолевых клеток линии Jurkat (рис.14).



**Рис. 16** Уровень фосфорилированных форм Hsp90 (Hsp90-P), определенный методом вестерн-блотт анализа, в опухолевых клетках линий THP-1, Jurkat и в мононуклеарных лейкоцитах (МНЛ) при действии этопозида *in vitro*: А - интактные клетки; В - культивирование с этопозидом в концентрации 8 мкг/мл.

Примечание (здесь и на рис.17): \* - достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре ( $p < 0,05$ )



**Рис. 17** Уровень фосфорилированных форм Hsp27 (Hsp27-P), определенный методом вестерн-блотт анализа, в опухолевых клетках линий THP-1, Jurkat и в мононуклеарных лейкоцитах (МНЛ) при действии этопозида *in vitro*: А - интактные клетки; В - культивирование с этопозидом в концентрации 8 мкг/мл.

Оценка экспрессии гена *hsp90* методом ПЦР «в реальном времени» показало, что при добавлении этопозида уровень мРНК *hsp90* в опухолевых клетках линий Jurkat и THP-1 повышался, а в мононуклеарных лейкоцитах, напротив, снижался. Кроме того, при действии этопозида экспрессия гена *hsp90* в опухолевых клетках была значительно выше, чем в мононуклеарных лейкоцитах (табл. 6).

При культивировании с этопозидом внутриклеточное содержание фосфорилированного белка Hsp27 в опухолевых клетках линий Jurkat и THP-1 достоверно снижалось ( $p < 0,01$ ), а в мононуклеарных лейкоцитах - увеличивалось

( $p=0,004$ ), по сравнению с количеством белка в интактных клетках. Стоит отметить, что при действии этопозиды минимальное содержание Hsp27-P было выявлено в опухолевых клетках линии Jurkat (рис. 17).

Таблица 6

**Уровень экспрессии мРНК гена hsp90 в опухолевых клетках линий Jurkat, ТНР-1 и в мононуклеарных лейкоцитах (МНЛ) при действии этопозиды *in vitro* (Me(Q1-Q3))**

| Условия культивирования \ Клетки        | Опухолевые клетки линии Jurkat (I) | Опухолевые клетки линии ТНР-1 (II) | МНЛ (III)                        | $p_{\text{межгрупповая}}$ ( $p_{\text{крит.}} < 0,05$ )                               |
|---|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---|
| Интактные клетки                        | 0,44<br>(0,12 – 0,57)              | 0,76<br>(0,13–2,56)                | 1,77<br>(1,31–2,13)              | $p_{\text{I-II}} > 0,05$<br>$p_{\text{I-III}} < 0,05$<br>$p_{\text{II-III}} > 0,05$   |
| Культивирование с этопозидом (8 мкг/мл) | 5,04<br>(1,27–6,30)<br>$p=0,002$   | 4,27<br>(2,06–4,86)<br>$p=0,01$    | 0,38<br>(0,19–0,47)<br>$p=0,003$ | $p_{\text{I-II}} > 0,05$<br>$p_{\text{I-III}} = 0,001$<br>$p_{\text{II-III}} = 0,018$ |

Примечание: здесь и в табл.7  $p$  – достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре

Таким образом, проведенное нами исследование позволило установить, что уровень мРНК hsp27 выше в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1. При добавлении этопозиды количество мРНК hsp27 увеличивалось в опухолевых клетках линии ТНР-1 и мононуклеарных лейкоцитах, а в опухолевых клетках линии Jurkat - снижалось (табл.7).

Таблица 7

**Уровень экспрессии мРНК гена hsp27 в опухолевых клетках линий Jurkat, ТНР-1 и в мононуклеарных лейкоцитах (МНЛ) при действии этопозиды *in vitro* (Me(Q1-Q3))**

| Условия культивирования \ Клетки        | Опухолевые клетки линии Jurkat (I) | Опухолевые клетки линии ТНР-1 (II) | МНЛ (III)                        | $p_{\text{межгрупповая}}$ ( $p_{\text{крит.}} < 0,05$ )                               |
|---|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---|
| Интактные клетки                        | 5,12<br>(4,79 – 5,84)              | 2,61<br>(1,89–4,46)                | 0,19<br>(0,15–0,31)              | $p_{\text{I-II}} > 0,05$<br>$p_{\text{I-III}} = 0,009$<br>$p_{\text{II-III}} = 0,006$ |
| Культивирование с этопозидом (8 мкг/мл) | 1,49<br>(1,26–2,19)<br>$p=0,006$   | 4,22<br>(1,83–7,20)<br>$p > 0,05$  | 4,93<br>(2,79–8,46)<br>$p=0,002$ | $p_{\text{I-II}} > 0,05$<br>$p_{\text{I-III}} = 0,02$<br>$p_{\text{II-III}} > 0,05$   |

Выраженность экспрессии гена hsp90 была выше в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров. Культивирование с этопозидом приводило к увеличению количества мРНК hsp90 в опухолевых клетках и снижению - в мононуклеарных лейкоцитах.

В свою очередь, внутриклеточное содержание белка теплового шока Hsp27 в опухолевых клетках было выше, а количество белка Hsp90, напротив, не различалось во всех исследованных клеточных моделях (опухолевые клетки линий Jurkat, ТНР-1 и мононуклеарные лейкоциты). Уровень фосфорилированной формы белка Hsp27 также был выше в опухолевых клетках и снижался при действии этопозида. Кроме того, нами было зарегистрировано увеличение содержания фосфорилированного белка Hsp90 в опухолевых клетках линии Jurkat, а при добавлении этопозида в культуральную среду - снижение.

Таким образом, действие ингибиторов белков теплового шока 17-ААG и KRIBB-3 приводит к усилению апоптотического эффекта индукторов программированной гибели клеток (rTNF $\alpha$ , этопозид, дексаметазон). Полученные нами данные свидетельствуют о широком влиянии Hsp90 и Hsp27 на различные молекулярные мишени, затрагивающие рецепторопосредованный, ядерный и митохондриальный пути регуляции апоптоза и зависящего от их посттрансляционной модификации и функционального статуса клеток.

### **Заключение**

Использование молекулярно-биологических, биохимических и генетических методов изучения патогенеза злокачественных новообразований дает возможность постоянно пополнять список новых молекулярных мишеней для действия агентов противоопухолевой терапии. Такие исследования формируют основу для развития новой стратегии лечения злокачественных заболеваний и создания таргетных лекарств, которые в недалеком будущем войдут в комплексное лечение пациентов с различными опухолями. Таргетная терапия представляет собой лечение, воздействующее на определенную молекулярную мишень, избирательно представленную в опухолевой клетке. Такими мишенями могут быть отдельные поверхностные молекулы – рецепторы различных сигнальных путей, играющих важную роль в патогенезе злокачественного процесса, или структурные компоненты клетки, внутриклеточные белки – посредники в передаче сигнала, отдельные молекулы РНК или структурные элементы генов. Создано несколько принципиально разных подходов к использованию этих мишеней, одним из которых является блокирование отдельных сигнальных каскадов, жизненно необходимых для существования опухолевой клетки с помощью, так называемых, «малых молекул».

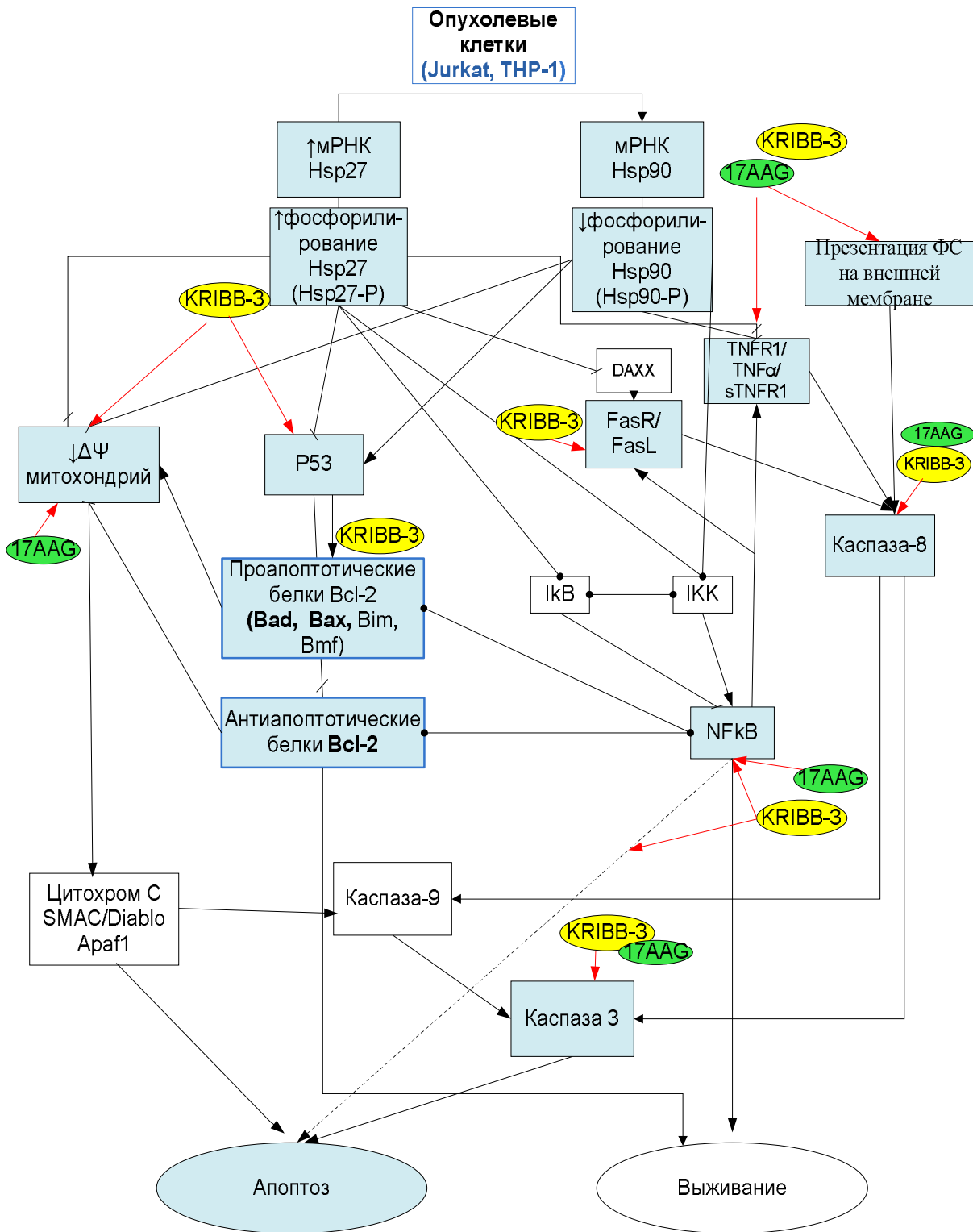
Известно, что гомеостаз в многоклеточном организме регулируется путем взаимодействия между его различными клетками, в каждой из которых заложена определенная генетическая программа, обуславливающая ее естественную гибель (апоптоз) под влиянием различных стимулов. Полагают, что именно апоптоз является одной из своеобразных альтернатив пролиферации клеток и, следовательно, может противодействовать онкогенезу.

На сегодняшний день выделяют несколько основных причин формирования резистентности опухолевых клеток к апоптозу. К их числу

относятся мутация гена p53, нарушение баланса семейства белков Bcl-2, десенсibilизация рецепторов смерти, повышенная экспрессия генов белков IAP и Hsp. Белкам теплового шока отводят существенную роль в развитии опухолевого процесса. При онкологических заболеваниях белки теплового шока синтезируются в больших количествах. При этом молекулярные механизмы участия белков теплового шока в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток еще недостаточно изучены. В связи с этим в настоящей работе в качестве методологического подхода было использовано селективное ингибирование Hsp90 и Hsp27 *in vitro* для установления роли белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в механизмах нарушения программированной гибели опухолевых клеток Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии.

Информация о биохимических сигнал-передающих путях регуляции апоптоза позволила эффективно применять антиоксидантную терапию, а также использовать в лечении онкологических заболеваний препараты, регулирующие концентрацию кальция либо активирующие (ингибирующие) различные протеинкиназы.

Проведенные нами исследования показали, что экспрессия мРНК, а также уровень фосфорилированных форм шаперона Hsp27 значимо выше в опухолевых клетках Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии, чем в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров. Экспрессия мРНК Hsp90 в исследованных клетках различалась не значимо, а содержание его фосфорилированной формы в опухолевых клетках было достоверно ниже, чем в мононуклеарных лейкоцитах. Кроме того, специфическое ингибирование Hsp27 и Hsp90 приводило к индукции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и ТНР-1 и не имело такового эффекта в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров. Выявленные в нашей работе молекулярные механизмы реализации программированной гибели опухолевых клеток при ингибировании Hsp90 и Hsp27 включают в себя воздействие на различные молекулярные мишени, участвующие в регуляции рецепторопосредованного, ядерного и митохондриального путей апоптоза (рис. 18). Реализация антиапоптотической функции белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 зависят от их посттрансляционной модификации (фосфорилирования). Программированная гибель опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1 угнетается на фоне высокого содержания фосфорилированных форм Hsp27 и низкого уровня фосфорилированных форм Hsp90, по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров. Белки теплового шока Hsp27 и Hsp90 участвуют в блокировании запуска рецепторопосредованного, ядерного и митохондриального путей реализации апоптоза, опосредуя свое действие через снижение активности каспаз-3 и -8, угнетение презентации TNFR1- и Fas-рецепторов, изменение содержания факторов транскрипции p53 и NF-κB, а также баланса белков семейства Bcl-2 и трансмембранного потенциала митохондрий в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1.



**Рис. 18 Молекулярные мишени воздействия специфических ингибиторов белков теплового шока на апоптоз опухолевых клеток линий Jurkat и THP-1 (по данным K. D. Shin et al., 2008; K. Guo et al., 2009; A.L. Joly et al., 2010 и результатам собственных исследований (выделено цветом))**

Примечание: —> - активирующее действие; —/— - ингибирующее действие; —•— двойственная роль; KRIBB-3 – селективный ингибитор Hsp27; 17-AAG- селективный ингибитор Hsp90

Стоит отметить, что ингибирование белков теплового шока потенцирует апоптотическое действие классических индукторов программированной гибели клеток (рекомбинантного TNF $\alpha$ , дексаметазона и этопозида).

Полученные нами результаты говорят о том, что белки теплового шока Hsp90 и Hsp27 являются молекулярными мишенями для таргетного воздействия на программированную гибель опухолевых клеток T-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии.

В связи с этим, возможность влиять на противоапоптотическую роль Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках с помощью их специфических ингибиторов, например 5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил) изоксазола (KRIBB3) и 17-ААГ (17-(Allylamino) geldanamycin), представляет большой интерес для разработки новых подходов в таргетной терапии онкологических заболеваний.

В настоящей диссертационной работе мы смогли ответить лишь на часть вопросов, связанных с молекулярными механизмами влияния белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 на нарушение регуляции апоптоза опухолевых клеток T-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии *in vitro*. Между тем представленные результаты обозначают новые горизонты для дальнейшего исследования данных механизмов *in vivo* и при других опухолях.

## Выводы

1. Опухолевые клетки линий Jurkat и ТНР-1 характеризуются повышенным уровнем экспрессии мРНК и высоким содержанием фосфорилированных форм Hsp27, низким уровнем фосфорилированных форм Hsp90, по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров, на фоне угнетения их программированной гибели.

2. Действие специфических ингибиторов белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 (17-аллиламино-17-гельданамицин и 5-(5-Ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl) isoxazole) *in vitro* приводит к повышению числа апоптотически измененных клеток в культурах опухолевых линий Jurkat и ТНР-1, не вызывает данного эффекта в культуре мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, и свидетельствует об антиапоптотической роли Hsp90 и Hsp27 в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1.

3. Белки теплового шока Hsp90 и Hsp27 ингибируют рецепторопосредованный путь реализации апоптоза опухолевых клеток (Jurkat и ТНР-1), снижая активацию каспаз -8 и -3.

4. Белки теплового шока Hsp27 и Hsp90 дифференцированно влияют на TNFR1, FasR и их лиганды в зависимости от типа клеток. Шаперон Hsp27 способствует продукции TNF $\alpha$  и FasL как в клетках линии Jurkat, так и ТНР-1; снижению презентации TNFR1 и FasR на мембране опухолевых клеток линии ТНР-1 и увеличению презентации FasR на мембране опухолевых клеток линии Jurkat. Действие белка теплового шока Hsp90 сопряжено с увеличением продукции TNF $\alpha$  и снижением презентации TNFR1 на мембране опухолевых клеток линии ТНР-1; увеличением продукции TNF $\alpha$ , FasL и

мембранносвязанных форм FasR, а также снижением презентации TNFR1 опухолевыми клетками линии Jurkat.

5. Белки теплового шока Hsp90 и Hsp27 препятствуют снижению трансмембранного потенциала митохондрий, что приводит к блокированию запуска митохондриального пути апоптоза опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1.

6. Шапероны Hsp90 и Hsp27 оказывают влияние на баланс белков семейства Bcl-2. Hsp27 участвует в механизмах снижения содержания проапоптотического белка Вах в опухолевых клетках линии Jurkat; белка Bad с проапоптотической функцией в опухолевых клетках линии ТНР-1; способствует увеличению внутриклеточного уровня антиапоптотического белка Bcl-2 как в клетках линии Jurkat, так и ТНР-1. С действием шаперона Hsp90 связано снижение содержания белка Bad в опухолевых клетках линии ТНР-1 и увеличение содержания проапоптотического белка Вах в опухолевых клетках линии Jurkat.

7. В условиях селективного ингибирования белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 *in vitro* при использовании 17-ААG и KRIBB-3, соответственно, в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 повышается уровень фактора транскрипции NF-κB.

8. Hsp90 и Hsp27 разнонаправленно влияют на содержание p53 в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1. В условиях селективного ингибирования Hsp27 *in vitro* в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 увеличивается уровень белка p53 (мутантного и дикого типа); при селективном ингибировании Hsp90 – содержание p53 в опухолевых клетках уменьшается.

9. В условиях ингибирования белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 *in vitro* происходит потенцирование апоптотического действия индукторов программированной гибели клеток (rTNFα, этопозида и дексаметазона) в культуре опухолевых линий Jurkat и ТНР-1, а также в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров.

10. Одним из механизмов апоптоз-индуцирующего действия этопозида на опухолевые клетки линий Jurkat и ТНР-1 является изменение экспрессии генов и фосфорилирования белков теплового шока (увеличение уровня мРНК Hsp90 (в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1); снижение уровня мРНК Hsp27 (в опухолевых клетках линии Jurkat) и уменьшение количества фосфорилированных форм Hsp90 и Hsp27 в клетках обеих линий).

### ***СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ***

1. Роль белка теплового шока 90 в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat /Кайгородова Е.В., Белкина М.В., Марошкина А.Н., Зима А.П. // Сб: Вопросы сохранения и развития здоровья населения республики Хакасия по итогам XII межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины» - г. Абакан, 2-3 июня 2009 г. – Абакан, 2009. – С. 242-243.

2. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе / Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Часовских Н.Ю., Кайгородова Е.В., Старикова Е.Г., Стариков Ю.В. Радзивил Т.Т. // **Цитология.** - 2009.- Т.51, №4. – С.329-334.



3. Роль факторов транскрипции p53 и NF-κB в редокс-зависимой дизрегуляции апоптоза / Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Часовских Н.Ю., Старикова Е.Г., Кайгородова Е.В., Стариков Ю.В., Филипенко М.Л., Боярских У.А. // **Вестник РАМН.** – 2009. - № 4. – С. 3-7.
4. Митогенактивированные протеинкиназы JNK и p38 являются редокс-зависимыми молекулярными мишенями нарушения апоптоза при окислительном стрессе / Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Кайгородова Е.В., Часовских Н.Ю., Старикова Е.Г. // **Успехи физиологических наук.** - 2009. - Т.40, №2. – С.3-11.
5. Белки семейства Bcl-2 участвуют в редокс-зависимой дизрегуляции апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови при воспалении /Часовских Н.Ю., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Филипенко М.Л., Боярских У.А., Старикова Е.Г., Кайгородова Е.В., Стариков Ю.В., Соколов Е. Г. // **Иммунология.** – 2009. - Т.30, №2. – С. 98-101.
6. Состояние системы MAP-киназ JNK и p38 в мононуклеарных лейкоцитах крови при воспалении / Часовских Н. Ю., Рязанцева Н. В., Кайгородова Е. В., Чечина О.Е., Соколов Е. Г., Новицкий В. В. // **Медицинская иммунология.** - 2009. - Т.11, №6. – С.515-522.
7. Действие ингибиторов белков теплового шока 90 и 27 на дексаметазон-индуцированный апоптоз опухолевых клеток /Е. В. Кайгородова, Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий, А.Н. Марошкина, М. В. Белкина, О.Е. Чечина, А. П. Зима // **Бюллетень сибирской медицины.** - 2010. - №3. – С.68- 71.
8. Роль белка теплового шока 90 в регуляции апоптоза опухолевых клеток / Е. В. Кайгородова, Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий, М. В. Белкина, А. Н. Марошкина // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** - 2010. - Т.150, №10.- С.424-427.
9. Effects of inhibitors heat shock proteins 90 and 27 on etoposide-induced apoptosis of tumor cells /Kaygorodova E., Ryazantseva N., Novitsky V., Belkina M., Maroshkina A. // The 6th International Congress of Pathophysiology "Gene-environment interaction in health and disease" (22-25 September 2010, Montreal, Canada) – Montreal (Canada), 2010. – P.69-70
10. Действие ингибитора белка теплового шока Hsp90 на активность каспазы-3 в опухолевых клетках линии Jurkat/ Кайгородова Е.В., Белкина М.В., Марошкина А.Н., Якушина В.Д., Коновалова Е.В. // **Материалы IV Международной научной конференции молодых ученых-медиков, Курск 25-26 февраля 2010 г.– Курск, 2010. - Т.1. - С.80-82**
11. Редокс-зависимые изменения продукции IL-8, -10 и апоптоза мононуклеарных лейкоцитов / Кайгородова Е.В., Старикова Е. Г., Чечина О. Е., Часовских Н.Ю., Жаворонок Т.В., Биктасова А.К., Сазонова Е.В., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. // **Бюллетень СО РАМН** – 2010. - Т.30, №5 - С. 6-11.
12. Molecular mechanisms of the oxidative stress effect on Bcl-2 family proteins / Losenkov I.S., Kleptsova L.A., Starikova E.G., Kaigorodova E.V., Maroshkina A.N.// **Вестник РГМУ.** - 2010. - № 2. – С.437
13. Реализация апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat при действии ингибиторов белков теплового шока 90 и 27 / Кайгородова Е.В. Белкина М.В., Марошкина А.Н, Якушина В.Д., Коновалова Е.В. / **Актуальные проблемы медицины: материалы 13-ой межрегиональной научно-практической конференции с международным участием; г. Абакан, 4-5- мая 2010 – Абакан, 2010. - С.256-258.**
14. Apoptosis induction in tumor cells by inhibitors heat shock proteins and dexamethasone /Maroshkina A. N., Kaygorodova E. V., Belkina M.V., Yakushina V. D., Konovalova E. V.// **Вестник РГМУ.** - 2010. - № 2. – С.438
15. Эффект ингибитора белка теплового шока 90 17-ААГ в TNF-α индуцированном апоптозе опухолевых клеток линии Jurkat / Якушина В.Д., Белкина М.В., Марошкина А.Н., Коновалова Е.В., Кайгородова Е.В.// **Материалы XVI межгородской конференции молодых учёных «Актуальные проблемы патофизиологии» Санкт-Петербург 21-22 апреля 2010 года - Санкт-Петербург, 2010. - С.197-198.**

16. The role of transcriptional factors p53 and NF $\kappa$ B in the induction of apoptosis during the oxidative stress in vitro / Kleptsova L.A., Losenkov I.S., Starikova E.G., Kaigorodova E.V., Belkina M.V. // Вестник РГМУ. -2010. - № 2. – С.436
17. . Влияние ингибитора белка теплового шока Hsp27 и дексаметазона на апоптоз опухолевых клеток линии Jurkat / Белкина М.В., Кайгородова Е.В., Марошкина А.Н., Якушина В.Д., Коновалова Е.В // Актуальные вопросы медицинской науки: Сб.научных работ студентов и молодых ученых Всероссийской научно-практической конференции смеждународным участием, посвященной 1000-летию Ярославля 21-23 апреля 2010. – Ярославль, 2010. - С.314.
18. Реализация апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat при действии ингибиторов белков теплового шока 90 и 27 / Кайгородова Е.В. Белкина М.В., Марошкина А.Н, Якушина В.Д., Коновалова Е.В. / Актуальные проблемы медицины: материалы 13-ой межрегиональной научно-практической конференции с международным участием; г. Абакан, 4-5- мая 2010. – Абакан, 2010. – С.256-258.
19. Особенность реализации апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов крови здоровых доноров в условиях ингибирования белка теплового шока 27 кДа in vitro/ Кайгородова Е.В., Марошкина А.Н., Белкина М.В., Коновалова Е.В., Якушина В.Д., Клебцова Л.А. // Медицинский академический журнал. - 2010. - Т.10, №5. - С.15-16
20. Митохондриальный путь апоптоза: роль Hsp27 в опухолевых клетках линии Jurkat / Марошкина А.Н., Белкина А.Н., Кайгородова Е.В., Зима А.П. // Сборник трудов Первой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». 23-26 ноября 2010, Санкт-Петербург, Россия / под ред. А.П. Кудинова, Б.В. Крылова. – СПб.: Изд-во Политехн.ун-та, 2010.- 291с. - Санкт-Петербург, 2010. - С.72-73
21. Белок теплового шока 90 кДа – молекулярная мишень для коррекции апоптоза опухолевых клеток / Е.В. Кайгородова, А.Н. Марошкина, М.В. Белкина, Е.А. Черкасова, М.В. Клименченко // **Сибирский онкологический журнал.** - 2011. - №1. - С.58-59
22. Апоптозмодулирующие эффекты белка теплового шока 90 кДа в опухолевых клетках / Кайгородова Е.В., Белкина М.В., Марошкина А.Н., Черкасова Е.А., Клименченко М.А. // Проблемы и перспективы современной науки. - 2011. - том 3, №1. - С.63-64
23. Влияние белков теплового шока на NF- $\kappa$ B – опосредованный сигнальный путь опухолевых клеток /Кайгородова Е.В., Белкина М.В., Марошкина А.Н., Клименченко М.А., Черкасова Е.А.// Актуальные проблемы медицины: материалы 14-й межрегиональная научно-практическая конференция с международным участием, посвященной 50-летию хакасской республиканской больницы им. Г.Я. Ремишевской, г. Абакан, 27-28 апреля 2011. – Абакан, 2011. - С.250-253
24. Исследование механизмов модуляции апоптоза Т-лимфоцитов / Якушина В.Д., Белкина М.В., Марошкина А.Н., Кайгородова Е.В., Васильева О.А. // Актуальные проблемы медицины: материалы 14-й межрегиональная научно-практическая конференция с международным участием, посвященной 50-летию хакасской республиканской больницы им. Г.Я. Ремишевской, г. Абакан, 27-28 апреля 2011. – Абакан, 2011. - С.262-265.
25. Белок теплового шока 90 – модулятор TNF $\alpha$ - индуцированного апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat /Кайгородова Е. В., Рязанцева Н. В., Новицкий В. В., Марошкина А. Н., Белкина М. В., Якушина В.Д. // **Вестник РАМН .** - 2011. - Т.11, № 8. - С.3-7
26. Суперсемейство рецептора фактора некроза опухоли и белок теплового шока 90кДа: молекулярные основы взаимоотношения /Н.В. Рязанцева, Е.В. Кайгородова, М.В. Белкина, А.Н. Марошкина, О.Е. Чечина, А.П. Зима, В.В. Новицкий // **Медицинская иммунология.** - 2011. - Т.13, №.2-3 - С. 247-252.

27. Молекулярные участники рецепторного пути апоптоза в опухолевых и нормальных лимфоцитах при ингибировании белка теплового шока 90 *in vitro* /Рязанцева Н.В., Кайгородова Е.В., Новицкий В.В., Белкина М.В., Марошкина А.Н., Клименченко М.А., Таширева Л.А. // **Сибирский онкологический журнал.** – 2011. - Т.44, №2 - С.52-56.
28. Роль Hsp90 в продукции TNF $\alpha$ , экспрессии TNFR1 при дексаметазон-индуцированном апоптозе опухолевых клеток линии Jurkat / Клименченко М.В., Черкасова Е.А., Белкина М.В., Марошкина А.Н., Кайгородова Е.В. // Вестник РГМУ. - 2011.- №1 - С.22-23
29. Белки семейства Bcl-2 – молекулярные мишени проапоптотического действия ИЛ-2 и ИЛ-4 /Чечина О.Е., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Сазонова Е.В., Биктасова А.К., Жукова О.Б., Марошкина А.Н., Белкина М.В., Кайгородова Е.В., Прохоренко Т.С. // **Иммунология.** – 2011. - Т. 32, № 3. – С. 127-130.
30. Роль сульфида водорода в регуляции апоптоза клеток /Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Старикова Е.Г. Клепцова Л.А., Якушина В.Д., Кайгородова Е.В.// **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** - 2011. - Т.151, №6. - С.646-650.
31. Функциональные взаимоотношения шаперона Hsp27 и белков семейства Bcl-2 в опухолевых клетках ТНР-1 /Черкасова Е.А., Марошкина А.Н., Белкина М.В., Клименченко М.В., Кайгородова Е.В.// Сб.статей Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» под ред.Зинченко В.П., Колесникова С.С., Бережнова А.В., г.Пушино, 2011. Т.2. – Пушино, 2011.- С.630-635.
32. Факторы, модулирующие апоптоз Т-лимфоцитов / Якушина В.Д., Белкина М.В., Марошкина А.Н., Кайгородова Е.В., Васильева О.А. // Сб. статей по материалам XII Российского конгресса молодых ученых с международным участием «Науки о человеке» Томск, 26-27 мая 2011г. – Томск, 2011. - С.75-76.
33. Кайгородова Е.В., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Апоптоз и белки теплового шока. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2012. – 188 с
34. Кайгородова Е.В. Молекулярные механизмы регуляторного влияния белка теплового шока 27 кДа на апоптоз опухолевых клеток // **Бюллетень сибирской медицины.** - 2011. - Т.10, №4. - С.71-76.
35. Белки теплового шока и митогенактивированные протеинкиназы JNK, p38: роль в адаптации и дизрегуляции клетки при стресс-индуцированном апоптозе/ Кайгородова Е.В., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В.// **Молекулярная медицина.** - 2012. - №1. - С.3-11.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

|   |  |
|---|--|
| АФК – активные формы кислорода                                | KRIBB3-5-(5-Ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)isoxazole  |
| МНЛ – моноклеарные лейкоциты                                  | NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; nuclear factor- $\kappa$ B) – ядерный фактор |
| ФС- фосфатидилсерин   | ТНР-1 – опухолевые клетки острой моноцитарной лейкемии человека  |
| 17-ААГ – 17-аллиламино-17-гельданамицин                       | r-TNF $\alpha$ – рекомбинантный TNF альфа  |
| AIF (apoptosis inducing factor) – апоптозиндуцирующий фактора |  |
| GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа                  |  |
| HSF (heat shock factor) – фактор теплового шока               |  |
| Hsp (heat shock proteins) – белки теплового шока              |  |
| Jurkat – опухолевые клетки Т-лимфобластного лейкоза человека  |  |