Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики Российской академии наук»

(ИПФ РАН)

На правах рукописи

# НЕРУШ АНАСТАСИЯ СЕРГЕЕВНА

## Участие пероксида водорода в процессе гибели опухолевых клеток при воздействии цисплатина

1.5.2 Биофизика

## ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н., старший научный сотрудник ИПФ РАН Орлова Анна Геннадьевна

Нижний Новгород - 2021

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 1	0
1.1 Особенности опухолевых клеток1	0
1.2 Апоптоз	2
1.1.1 Типы клеточной гибели1	2
1.2.2 Стадии и особенности апоптоза 1	5
1.2.3 Способы определения апоптоза	20
1.3 Активные формы кислорода	23
1.3.1 Основные типы АФК	23
1.3.2 Пероксид водорода	0
1.3.3 Защита клетки от АФК 3	57
1.3.4 Способы определения АФК в клетке	1
1.4.1 Основное действие цисплатина, сигнальные каскады	50
1.4.2 Цисплатин и пероксид водорода5	;7
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ5	;9
2.1 Оборудование и материалы 5	;9
2.2 Методы	60
2.2.1 Культивирование опухолевых культур6	60
2.2.2 Определение жизнеспособности клеточных линий	51
2.2.3 Изучение динамики уровня $H_2O_2$ на разных стадиях клеточной гибели . 6	52
2.2.4 Изучение динамики уровня H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> в условиях использования ловушек	
АФК	64
2.2 Статистический анализ данных	6
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	58

3.1 Определение жизнеспособности клеточных линий	8
3.2 Разработка методики изучения уровня H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> одновременно с механизмом	
клеточной гибели7	5
3.3 Изучение динамики уровня $H_2O_2$ на разных стадиях клеточной гибели8	0
3.4 Изучение динамики уровня $H_2O_2$ в условиях использования ловушек АФК . 10	9
3.4.1 Определение апоптоза по экстернализация фосфатидилсерина 10	9
3.4.2 Определение апоптоза по изменению мембранного потенциала	
митохондрий13	0
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	6
ВЫВОДЫ	7
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 13	8
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	2

#### введение

### Актуальность темы исследования

В современной экспериментальной онкологии одной из особенно актуальных задач остается разработка более эффективных и менее опасных лекарственных препаратов. Для уменьшения побочных эффектов в создании таких препаратов большое внимание уделяется особенностям опухолевых клеток в сравнении с нормальными. Вследствие этого большое значение приобретают сведения об избыточной продукции активных форм кислорода (АФК) в опухолевых клетках [1], необходимых для клеточной пролиферации и роста [2]. Первоначально АФК рассматривали как побочные продукты метаболизма клеток, способные вызывать повреждения, окислительный стресс и старение организма [3]. Однако в настоящее время показано их участие в регулировании сигнальных механизмов нормальных физиологических реакций [4, 5]. В зависимости от концентрации, АФК могут играть разные роли в возникновении и развитии рака: низкие концентрации АФК способствуют активации и дальнейшему распространению клеточного сигнала, в то время как высокие дозы способны индуцировать развитие апоптоза [6-9].

## Степень разработанности темы исследования

Среди всех АФК наибольший интерес вызывает пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). К настоящему времени накопилось большое количество исследований, указывающих на его роль в клеточной пролиферации и миграции клеток [10-13], в повышенном ангиогенезе [14, 15], передаче апоптозного сигнала [16-18], злокачественной трансформации и метастазировании [19-21]. Все эти данные наряду со способностью легко проникать через плазматические мембраны позволяют рассматривать H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в качестве вторичного мессенджера [22-25]. Кроме того, некоторые исследования показали, что опухолевые клетки обладают

повышенной восприимчивостью к  $H_2O_2$ , а определенные концентрации  $H_2O_2$  способны вызывать гибель опухолевых, но не нормальных клеток [22, 26, 27].

В тоже есть работы, подтверждающие, что время, увеличение внутриклеточного АФК.  $H_2O_2$ , при уровня В том числе помощи химиотерапевтических препаратов, может являться эффективным способом уничтожения раковых клеток, а также помочь в борьбе с устойчивостью опухолей к подобным препаратам [28, 29].

Одним из активно изучаемых противоопухолевых агентов, способных вызывать повышенное образование АФК, является цисплатин. Цисплатин относится к группе платиносодержащих препаратов и широко используется в лечении злокачественных новообразований [30].

Данная работа посвящена изучению взаимосвязей между изменением внутриклеточного уровня пероксида водорода в обработанных цисплатином клетках и стадиями клеточной гибели. Полученные сведения могут быть использованы в дальнейшем изучении пероксида водорода в качестве компонента альтернативного пути избирательного воздействия на гибель опухолевых клеток при химиотерапии.

#### Цели и задачи

Целью данной работы являлось исследование роли пероксида водорода в цисплатин-индуцированной гибели клеток HeLa Kyoto.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучение влияния цисплатина на жизнеспособность опухолевых клеток HeLa Kyoto *in vitro*.

2. Разработка методики специфичной оценки уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> одновременно с механизмами клеточной гибели.

3. Анализ дозо-временной динамики цисплатин-индуцированных изменений уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в живых и апоптотических клетках.

4. Изучение влияния цисплатина на жизнеспособность и уровень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в условиях добавления ловушек АФК.

#### Научная новизна

Разработана новая методика дискретной оценки уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в популяциях жизнеспособных и апоптотических клеток. Данная методика на основе проточной цитофлуориметрии предполагает использование культур с генетическикодируемыми сенсорами HyPer2 и SypHer2 в сочетании с флуоресцентными красителями на апоптоз. Показано, что цисплатин-индуцированное накопление  $H_2O_2$ В опухолевых клетках происходит раньше экстернализации фосфатидилсерина.

Пероксид водорода может быть рассмотрен как индуктор апоптоза при действии цисплатина, о чем свидетельствует одновременное возрастание концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и проявление ранних обратимых признаков апоптоза (потеря мембранного потенциала митохондрий), которые предотвращаются на фоне ловушек АФК.

## Научно-практическая значимость работы

Разработанная методика может быть использована для оценки изменений внутриклеточных уровней H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и pH, а также механизмов клеточной гибели при воздействии различных противоопухолевых агентов и разнообразных повреждающих факторов на исследуемые клеточные культуры.

Методика может быть применена для фундаментальных исследований, направленных на выявление особенностей редокс-статуса опухолевых клеток и его изменений при различных внешних условиях, а также определения точных путей и механизмов влияния H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на процессы апоптоза в опухолевых культурах.

Полученные в работе данные могут послужить основой для разработки тестирования *in vitro* новых менее токсичных и более эффективных противоопухолевых препаратов.

#### Методология и методы исследования

Работа проводилась на клетках карциномы шейки матки HeLa Kyoto, прошедших трансфекцию флуоресцентными сенсорами HyPer2 или SypHer2 (предоставлены Институтом биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова), а также не подвергшихся данной трансфекции. Сенсор HyPer2, обладающий чувствительностью к пероксиду водорода и pH, использовался в паре с сенсором SypHer2, чувствительным только к pH. Для определения жизнеспособности клеточных линий и подбора доз препарата при воздействии цисплатина применялись метилтетразолиевый тест и метод окрашивания трипановым синим.

Для определения уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках на разных стадиях клеточной гибели использовалась методика проточной цитофлуориметрии с использованием набора на апоптоз PE Annexin V apoptosis detection kit I. Набор красителей позволяет отделить клетки с поврежденной мембраной (7–аминоактиномицин D, 7-AAD) и/или с экстернализацией фосфатидилсерина от жизнеспособных клеток. Кроме того, использовался флуоресцентный краситель, маркирующей изменение мембранного потенциала митохондрий (этиловый эфир тетраметилродамина, TMRE), являющегося показателем более ранней стадии апоптоза.

Для подтверждения роли H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ответе опухолевых клеток на цисплатин использовались ловушки АФК: N-ацетил-L-цистеин (NAC) и диметилтиомочевина (ДМТМ).

#### Личный вклад автора

В диссертации представлены результаты исследований, выполненных самим автором, включая постановку задач, планирование и проведение экспериментов, анализ и интерпретацию полученных результатов. Также автор совместно с соавторами участвовал в написании научных статей и апробации полученных результатов на семинарах, конференциях и симпозиумах.

#### Положения, выносимые на защиту

- 1. Пероксид водорода является индуктором апоптоза опухолевых клеток при действии цисплатина.
- 2. Динамика изменения уровня пероксида водорода в опухолевых клетках дифференциальна для живых и апоптотических клеток.
- Повышение уровня пероксида водорода происходит на фоне потери мембранного потенциала митохондрий и предшествует экстернализации фосфатидилсерина.
- 4. Добавление ловушек АФК предотвращает цисплатин-индуцированное повышение уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в опухолевых клетках, способствуя сохранению митохондриального мембранного потенциала, а также предотвращая выход фосфатидилсерина на внешнюю поверхность плазматической мембраны и гибель клеток.

## Соответствие паспорту научной специальности.

Результаты проведённого исследования соответствуют области исследования специальности 1.5.2 – биофизика.

### Степень достоверности и апробация работы

Основные результаты работы были представлены на следующих всероссийских и международных конференциях: Международной конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пущино, 2012); IV Съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012); V Всероссийском С международным участием медико-биологическом конгрессе молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012» (Тверь, 2012); IV Международном симпозиуме «Topical problems of biophotonics - 2013» (Нижний Новгород - Ярославль - Казань -Нижний Новгород, 2013); «Форуме молодых ученых 2013» (Нижний Новгород, 2013); VI Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине» (Троицк, Москва, 2013); VII Съезде Российского фотобиологического

общества (Шепси, 2014); Международной конференции «SPIE BiOS» (Сан-Франциско, 2014); V Международном симпозиуме «Topical problems of biophotonics – 2015» (Нижний Новгород – Елабуга – Нижний Новгород, 2015); 7ом Финско-Русском симпозиуме «Photonics and Laser Symposium» (Caparoв, 2015); Международной конференции «Conference on advanced fluorescence imaging methods» (Сочи, Дагомыс, 2016); Международной конференции «OSA Biomedical Optics 2016» (Форт-Лодердейл, 2016); VI Международном симпозиуме «Topical problems of biophotonics – 2017» (Санкт-Петербург – Нижний Новгород, 2017); 17ом Международном конгрессе «Congress of the European Society for Photobiology» (Пиза, 2017); Международной конференции «SPIE ECBO» (Мюнхен, 2019).

## Публикации

По материалам диссертации опубликовано 22 научные работы, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в перечень ВАК, 1 патент, 15 тезисов конференций (в том числе 3 в Web of Science).

## Конкурсная поддержка работы

Проведенные исследования были выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 13-04-97165, 26 16-34-01112).

#### Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 200 страницах печатного текста и содержит 49 рисунков, 2 таблицы. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 549 источников, из них 526 иностранных.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1 Особенности опухолевых клеток

В человеческом организме постоянно происходят процессы обновления тканей, что обеспечивается регулярным делением клеток, а также устранением старых, нежизнеспособных или поврежденных клеток. Каждая клетка проходит проверку несколькими системами, позволяющими обеспечить правильную репликацию, в случае возникновения ошибок деление оказывается невозможным. Эта важная характеристика здоровых неопухолевых клеток позволяет поддерживать стабильность организма и является первоочередным признаком «нормальности». Опухолевые клетки развиваются по собственным законам, позволяющим обойти системы контроля, в результате они продолжают делиться даже при наличии ошибок в системе репликации. В результате аберрантного деления происходит накопление ошибок, что приводит к видоизменению опухолевых клеток, обуславливая их устойчивость к действию некоторых лекарственных препаратов [31, 32].

Для здоровых соматических клеток характерен предел Хейфлика, ограничивающий количество делений клетки, в опухолевых же клетках (как и в половых) теломераза, отвечающая за восстановление концов хромосом, остается активной, что позволяет им делиться бесконечное количество раз. Другой особенностью опухолевых клеток является отсутствие контактного торможения, они продолжают рост и деление даже при плотном окружении другими клетками [33]. Росту опухоли частично способствует потеря генов-супрессоров опухолей, таких как p53, и восстановление поврежденной ДНК [32]. Ген ТР53, кодирующий белок p53, подвергается мутациям более, чем в 50% случаев рака [34]. Активация p53 происходит в ответ на повреждение ДНК, в результате чего запускается транскрипция группы генов, происходит репарация и репликация ДНК, а в случаях сильных повреждений ДНК – запуск программы апоптоза. Однако последние исследования показывают, что p53 также может быть задействован в процессах регуляции различных метаболических механизмов, способен стабилизировать гликолиз, ограничить выработку АФК, способствуя выживанию клеток [35, 36]. Важной особенностью опухолевых клеток является повышенное содержание АФК, в том числе и пероксида водорода [1, 9].

Отличительной чертой энергетического обмена опухолевых клеток является частичное расщепление молекулы глюкозы. В отличие от нормальных клеток, в процессе которых происходит формирование 36 молекул лыхания аденозинтрифосфата (AT $\Phi$ ) при расщеплении одной молекулы глюкозы, дыхание опухолевых клеток сопровождается синтезом лишь 2 молекул АТФ. Таким образом, опухолевые клетки имеют большую потребность в глюкозе, чем здоровые клетки [31]. Это происходит по причине отсутствия окислительного фосфорилирования в опухолевых клетках даже в присутствии большого количества кислорода. Таким образом, распад глюкозы происходит без участия кислорода – аэробный гликолиз. Такая особенность опухолевых клеток помогает выживать в организме в условиях гипоксии, вызванной неправильным развитием и искривленностью кровеносных сосудов в опухолях, а также чрезвычайно ростом и большим количеством делений опухолевых клеток. быстрым Выраженная зависимость опухолевых клеток от гликолиза как единственного источника АТФ, получившая название «эффект Варбурга», характерна для большинства опухолевых клеток [37]. Также для раковых клеток характерно неэффективное использование глутамина, который выделяется в виде отходов. Нормальные клетки используют его в качестве донора амино- и амидных групп для синтеза аминокислот, и азота – для образования нуклеотидов [38]. Такие изменения метаболизма приводят к ряду последствий: уменьшается вероятность распознавания опухолевых клеток иммунной системой; появляется возможность использовать продукты аэробного гликолиза для синтеза жизненно необходимых

веществ; активируются онкогены, позволяющие опухолевым клеткам избегать смерти.

К особенностям микроокружения опухоли в организме относят гипоксию, которая является признаком ее злокачественности. О гипоксии, как правило, говорят при снижении уровня кислорода в тканях до субфизиологичных значений - 5-10 мм рт. ст. (в здоровых тканях - 40-60 мм рт. ст.) [39]. Возникающая в опухоли гипоксия способствует проявлению онкогенных свойств TWIST белков. В ответ на гипоксию происходит активация HIF1α и HIF2α [40], что приводит к продукции VEGF через TWIST1 и провоцирует неоангиогенез, а также синтезу транспортеров глюкозы GLUT-1/-3, стимулирующих гликолиз; карбоангидразы-9, регулирующей pH; матриксных металлопротеаз, опосредующих инвазию: (ZEB1, факторов перехода SNAIL, TWIST), эпителио-мезенхимального способствующих метастазированию. Дополнительным механизмом, способствующим прогрессированию опухолей, является подавление белками TWIST транскрипционного фактора р53 – супрессора злокачественных новообразований [41-43].

#### 1.2 Апоптоз

## 1.1.1 Типы клеточной гибели

Говоря о клеточной гибели, чаще всего подразумевают аутофагию, апоптоз и некроз. Во время аутофагии происходит разборка ненужных, отработанных частей клетки [44]. Аутофагия является естественным механизмом саморегуляции клетки. Можно выделить: 1) микроаутофагию, при которой за счет работы лизосом происходит разборка отдельных макромолекул и обломков клеточных мембран, 2) макроаутофагию - растворение отделившимся ЭПР-подобным

компартментом отдельных участков цитоплазмы, 3) шапероновую аутофагию растворение перенесенных шаперонами частично денатурированных белков в лизосоме [45-47].

В большинстве случаев клетки погибают путем апоптоза, на уровне организма такой механизм гибели предпочтительней, поскольку он в меньшей степени вовлекает окружающие ткани и, в отличие от некроза, не вызывает последующей воспалительной реакции. Апоптоз наблюдать можно в эмбриональном развитии, например при формировании межпальцевой образовании пальцев передних участвующей перегородки, В И задних конечностей. Такой тип клеточной гибели является программируемым, высоко регулируемым и контролируемым процессом [48].

Также апоптоз может быть вызван различными внешними и внутренними процессами: воздействием химических агентов, низких или высоких температур, ионизирующих излучений, недостатком ростовых факторов и т.д. Помимо этого незначительное внешнее воздействие может стимулировать внутренние факторы развития апоптоза [49]. Морфологические особенности апоптоза включают в себя: конденсацию хроматина, «уплотнение клетки», сморщивание цитоплазматической мембраны, блеббинг (от англ. «blebbing» – пузырение) мембраны с последующим образованием апоптозных телец. Содержимое погибающей клетки, заключенное в апоптозные тельца, в дальнейшем поглощается макрофагами и соседними клетками [50, 51].

Некроз, так же, как и апоптоз, может вызываться множеством факторов, которые всегда носят острый характер. Различия между данными процессами заключаются в морфологической картине погибающих клеток. При некрозе клетка набухает, происходит повреждение всех клеточных органелл, хроматин не конденсируется, происходит вакуолизация ЭПР, клетка лизируется, в конечном итоге клеточные мембраны разрываются, выбрасывая все содержимое во внеклеточную среду. Это все приводит к повреждению соседних клеток, вызывая воспалительный ответ. В последние годы появились работы, показывающие, что, помимо некроза, вызванного чрезмерно экстремальными условиями, существует примеры, когда он может вызываться нормальными физиологическими процессами и даже сопровождаться апоптозом, что также может считаться некой формой «запрограммированного события» [52, 53].

Идентификация типа клеточной гибели бывает временами затруднена из-за особенностей гибели конкретного типа тканей. Так, например, набухание митохондрий с разрывом их внешней мембраны изначально считалось характеристикой некроза, но позже подобное набухание было выявлено и при апоптозе [54].

Помимо этого, вопрос об отсутствии влияния на окружающие клетки при повреждении одной из них апоптозом также ставится под сомнение, поскольку в ряде исследований был выявлен «коллективный апоптоз» [55, 56].

Аутофагия, апоптоз и некроз относятся к программируемой клеточной гибели (ПКГ). К настоящему моменту ПКГ имеет более сложную классификацию, выделяют: внутренний апоптоз; внешний апоптоз; некроз, зависимый от проницаемости митохондрий (MPT-driven necrosis, от англ. «mitochondrial permeability transition-driven necrosis»); некроптоз; ферроптоз; пироптоз; партанатоз; энтоз; NETos; иммуногенная клеточная гибель; клеточная гибель, зависимая от лизосом; клеточная гибель, зависимая от аутофагии [57]. Для каждого из видов ПКГ характерен набор признаков, приближающих его либо к апоптозу, либо к некрозу. Отдельно вынесен такой тип клеточной гибели, как «митотическая катастрофа». Ее причинами являются грубые нарушения в ходе митоза: К-митозы, мультиполюсные мета- и анафазы, отставание хромосом в мета- и анафазе, ингибирование сборки микротрубочек веретена деления и т.д. [58, 59]. Следует отметить, что не все митотические нарушения заканчиваются гибелью клеток. Так, например, недостаток генетического материала может быть скомпенсирован эндорепродукцией системами клетки и полиплоидизацией генома [60].

## 1.2.2 Стадии и особенности апоптоза

Существует несколько классификаций апоптоза по стадиям: основанная на агрегации ядерного хроматина и образовании апоптозных телец, на скорости и обратимости апоптоза и т.д.

Наиболее часто используется следующее деление апоптоза на 3 стадии:

1 – сигнальная стадия, или стадия инициации,

2 – эффекторная стадия, или стадия готовности к апоптозу,

3 – деградационная, или стадия развития апоптоза [61].

## Инициация апоптоза

Выделяют два основных механизма инициации апоптоза:

Экстраклеточный (рецепторозависимый) механизм инициации апоптоза. Его инициация связана с внешним воздействием на клетку и начинается со связывания специфичных лигандов (TNFα, FASL и др.) с «рецепторами смерти» плазматической мембраны [62]. Данные рецепторы являются трансмембранными белками, содержащими последовательность в цитоплазматическом участке белка из 80 аминокислот, получившую название «домен смерти» [63, 64].

Лиганды тримеризуют рецепторы смерти, активируя их, за счет чего ассоциированный с рецептором смерти адаптер вступает во взаимодействие с эффектором – прокаспазой. В результате такой последовательности взаимодействий происходит активация каспаз. Каспазы представляют собой цистеиновые протеазы, расщепляющие в белках связи после аспартата [63]. В зависимости от способа активации, каспазы, участвующие в апоптозе, делятся на инициирующие и эффекторные. Инициирующие каспазы активируются путем автокаталитических реакций при участии вспомогательных факторов, затем подвергаются специфическому расщеплению и воздействуют на эффекторные прокаспазы, превращая их в активные ферменты на следующей стадии апоптоза. К инициирующим каспазам относят каспазы 2, 8, 9, 10; к эффекторным – 3, 6, 7

[65]. Активации через рецепторы смерти подвергаются инициирующие каспазы 2, 8, 10, активация каспазы 9 связана с митохондриальным механизмом инициации апоптоза [48]. Сложные комплексы, активирующие каспазы, носят название апоптосомы (апоптосомные шапероны, «сигнальный комплекс, индуцирующий смерть», англ. «DISC» – «death-inducing signaling complex») [66]. Таким образом, апоптосома представляет собой цепочку взаимодействий «лиганд – рецептор – адаптер – прокаспаза». Поскольку передача сигнала идет через ряд посредников, этот механизм протекает медленнее, чем, например, передача сигнала в ионотропных каналах.

Внутриклеточный (митохондриальный) механизм инициации апоптоза связан с выходом апоптогенных белков из межмембранного митохондриального пространства [66]. Этот процесс может происходить за счет повреждений и/или разрывов мембран митохондрий, либо за счет открытия каналов на внешней стороне митохондрий. Одной из причин, способствующей повреждению поверхности наружной митохондриальной мембраны, является олигомеризация апоптотических белков семейства Bcl-2: Bax, Bak, и их встраивание в ее структуру [67-69]. Это приводит к повышению проницаемости наружной мембраны митохондрий (МОМР, от англ. «Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization»). Клетки, дефицитные по Bax и Bak, проявляют устойчивость к гибели через митохондриальный механизм апоптоза, что указывает на особую значимость этих белков в данном процессе [68, 70].

Вслед за этим происходит раскрытие пор мембран митохондрий, снижение (митохондриального митохондриального потенциала трансмембранного потенциала,  $\Delta \Psi m$ ), «развертывание» внутренней мембраны и увеличение матрикса митохондрий. Протонный градиент, образуемый цепочкой реакций окислительного фосфорилирования и создающий  $\Delta \Psi m$ , активно используется АТФ-синтетазой для получения АТФ путем соединения аденозиндифосфата (АДФ) и свободного фосфата, данный процесс является показателем активности клетки. Увеличение пор приводит разобщению окислительного К фосфорилирования, увеличению содержания Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме, истощению

митохондриального пула АТФ, нарушению осмотического равновесия, высвобождению прокаспаз 2, 3, 9 и т.д.

Повреждение митохондрий может происходить одновременно с повреждением эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Но в некоторых случаях именно ЭПР считается мишенью, с которой начинается развитие апоптоза, приводящее в последующем к активации каспазы 4 и каспазы 12 [71, 72]. Высвобождению и активации прокаспазы-12 из ЭПР также способствует увеличение концентрации Ca<sup>2+</sup> [73].

Из митохондрий в цитозоль начинает выходить цитохром С, один из значимых в апоптозе элементов. Он связывается с активирующим фактором-1 апоптотической протеазы (Apaf-1, от англ. «Apoptosis protease activating factor-1»), а затем с прокаспазой 9, образуя белковый комплекс, называемый апоптосомой [48]. Апоптосома расщепляет прокаспазу 9 до активной ее формы – каспазы 9, которая, в свою очередь, приводит к активации эффекторной каспазы 3. Однако для апоптоза, вызванного стрессом ЭПР, комплекс цитохрома С с Apaf-1 не является существенным [74].

## Эффекторная стадия апоптоза

Эффекторная фаза апоптоза характеризуется постепенным повреждением всех клеточных структур, при этом могут подвергаться развитию реакции одного из механизмов индукции апоптоза, либо они сливаются в один общий поток последующих реакций [63].

Активированные каспазами 2, 8, 9, 10 эффекторные каспазы 3, 6, 7 приводят к прямому или опосредованному разрушению клеточных структур, помимо этого, подвергая деструкции антиапоптозные белки семейства Bcl-2, они повреждают систему репарации и репликации ДНК [63, 66] Основную роль в апоптозе играет активированная эффектроная каспаза 3, она подключает в апоптоз цитоплазматические белки, активирует фосфолипазу А, протеинкиназу С, ферменты репликации и репарации, ингибиторы эндонуклеаз и т.д. [61].

Увеличенная концентрация  $Ca^{2+}$  в цитоплазме стимулирует его переход в активное состояние за счет связывания с кальмодулином. Кальций в таком состоянии способствует активации цистеиновых и сериновых протеаз, расщепляющих и повреждающих белки цитоскелета [75], а также активирует трансглутаминазу, сшивающую полиамины и белковые молекулы [76].

 $Ca^{2+}$ концентрации Также увеличение приводит к открытию неспецифических пор, изменяющих проницаемость мембраны митохондрий (mPTP, от англ «Mitochondrial permeability transition pore») [77]. mPTP представляет собой Ca<sup>2+</sup>-зависимый канал, образованный комплексом белков, проходящих сквозь митохондриальные мембраны. Точный состав mPTP поры на данный момент неизвестен, существует несколько предположений, что его компонентами могут являться аденин-нуклеотидный транспортер (ANT, от англ. «adenine nucleotide transporter»), потенциал-зависимый анионный канал (VDAC, от англ. «voltage-dependent anion channel») и циклофилин D [78-80]. Считается, что в матрикс Ca<sup>2+</sup> поступает при помощи Ca<sup>2+</sup>-унипортера, а высвобождается при помощи Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> и H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-антипортеров, либо через mPTP [81, 82]. Концентрация Ca<sup>2+</sup> играет регуляторную роль в работе mPTP, активируя ее открывание с матриксной стороны и блокируя с наружной стороны митохондриальной мембраны. При этом Ca<sup>2+</sup> активирует матриксный белок циклофиллин D, участвующий в открытии канала mPTP [82].

В нормальном состоянии каналы mPTP закрыты, их открытие приводит к выходу цитохрома С, изменению мембранного потенциала, поступлению ионов и воды в матрикс митохондрий и их набуханию. Это провоцирует разрыв внешней мембраны и поступление «белков апоптоза» в цитоплазму с развитием соответствующих реакций [83].

Еще одним важным эффектором апоптоза является флавопротеин AIF (от англ. «Apoptosis-inducing factor»), который также высвобождается из межмембранного пространства митохондрий, а попадая в клеточное ядро, активирует эндонуклеазы, фрагментирующие ДНК, и способствует конденсации хроматина. Это действие AIF не зависит от каспазного каскада, апоптоз будет возникать при высвобождении AIF из митохондрий даже в условиях его ингибирования [84].

Все эти процессы внешне выражаются в виде выступов на плазмалемме и в сморщивании клетки, что можно визуализировать с помощью высокоразрешающей микроскопии.

#### Деградационная стадия апоптоза

На третьей стадии апоптоза происходит активное развитие каспазного каскада и соответствующих реакций в клетке. Активно идут процессы расщепления белков, деполимеризации микротрубочек цитоскелета. Характерной чертой начала деградационной стадии является «округление» клетки, связанное с образованием кортикальных периферийных образованных колец, реорганизованными актиновыми микрофиламентами. Происходит процесс кареорексиса - фрагментация и расщепление ДНК нуклеазами. Однако в некоторых случаях апоптоз протекает без фрагментации ДНК [66]. Данная стадия апоптоза характеризуется переходом маркеров апоптоза с внутренней поверхности плазматической мембраны внешнюю. на что помогает фагоцитирующим клеткам распознать апоптозные. Данные маркеры являются фофсфолипидами, содержащими фосфосерин: фосфатидилсерин, тромбоспондин и т.д. В нормальном состоянии фосфатидилсерин перемещается АТФ-зависимой флиппазой с внешнего на внутренний слой плазматической мембраны, во время апоптоза работа флиппазы нарушается и фосфатидилсерин скапливается на внешней поверхности, помогая фагоцитирующим клеткам, содержащим ассоциирующиеся с фосфатидилсерином белки, распознавать апоптотические клетки [63].

Внутреннее содержимое клетки разделяется мембранами на отдельные области и происходит формирование мембранных везикул, апоптозных телец. Данный процесс получил название блеббинг [85-87]. После чего остатки клетки поглощаются макрофагами или соседними клетками [61, 88].

#### 1.2.3 Способы определения апоптоза

Поскольку апоптоз иногда довольно сложно идентифицировать или отличить от других видов ПКГ, большое значение имеют способы его определения. К настоящему времени разработано несколько методов, позволяющих обнаружить его в клеточных культурах или даже в живых организмах [89]. При работе с клеточными культурами наиболее часто используются методы определения апоптоза, основанные на изменении  $\Delta \Psi m$ , выходе цитохрома С из митохондрий, активации каспазы-3, а также на основе фрагментации ДНК.

Все виды апоптоза (инициируемые как по внутреннему, так и по внешнему механизму) неразрывно связаны с активацией каспазы-3 [90-94]. Прокаспаза-3 является неактивной формой каспазы-3, при ее расщеплении происходит активация и запускается ряд событий, ведущих к апоптозу [95-97]. Многие из расщепленных фрагментов можно пометить при помощи субстрат-специфичных антител и обнаружить при помощи вестерн-блоттинга или при помощи проточной цитометрии целых клеток [98]. Дополнительным механизмом подтверждения апоптоза может являться предварительная обработка культуры ингибиторами каспазы-3 zVAD-fmk или DEVD-fmk [99]. Также для подтверждения работы каспазы-3 могут использоваться антитела, специфичные фрагментам К каспазой-3, например, поли(АДФ-рибоза)субстратов, расщепляемых К полимеразе (PARP, от англ. «poly(adenosine ribose) polymerase») [100]. Разработан ряд генетически-кодируемых сенсоров активности каспаз, основанных на принципе прекращения FRET (англ. «Fluorescence Resonance Energy Transfer») при расщеплении каспазного субстрата И вызванного ИМ расхождения флуоресцентных или люменесцентных доменов сенсора [101].

Одним из показателей жизнеспособности клетки является наличие митохондриального трансмембранного потенциала ( $\Delta \Psi m$ ).  $\Delta \Psi m$  формируется за счет окислительного фосфорилирования, в процессе которого происходит активный перенос положительно заряженных протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану в межмембранное пространство и накоплению

отрицательного заряда на матриксной поверхности внутренней мембраны митохондрий. Цитохром С переносит электроны из комплекса III в комплекс IV по цепи переноса электронов, способствуя накачке протонов в митохондриальное межмембранное пространство [102], поэтому он крайне важен для поддержания  $\Delta\Psi$ m.

В нормальных физиологичных условиях цитохром С располагается в межмебранном пространстве митохондрий [103, 104]. Высвобождаясь в цитозоль во время апоптоза цитохром С активирует каспазный каскад [104]. Выход цитохрома С из митохондрий приводит к остановке переноса протонов, вызывая быструю диссипацию ΔΨm. Измерение количества цитохрома C в цитозоле и во внеклеточном пространстве используется как метод определения апоптоза [105, 106].

Таким образом, потеря  $\Delta \Psi m$  тесно связана с высвобождением цитохрома С и часто используется в качестве маркера апоптоза [98, 107]. Изменение  $\Delta \Psi m$  можно обнаружить, окрашивая клетки положительно заряженными красителями, этиловым эфиром тетраметилродамина (TMRE, например, ОТ англ. «tetramethylrhodamine ethyl ester», этиловый эфир тетраметилродамина). TMRE является красным флуоресцентным красителем, который можно обнаружить проточной цитометрии флуоресцентной методами или микроскопии. Интенсивность флуоресценции TMRE окрашенных клеток будет указывать на высокий или низкий  $\Delta \Psi m$ , при этом интенсивнее окрашиваются здоровые клетки с сохраненным  $\Delta \Psi m$  [98].

Помимо TMRE для определения ΔΨm также используется метиловый эфир тертраметилродамина (TMRM, от англ. «tetramethylrhodamine methyl ester»). TMRM флуоресциирует оранжевым, накапливаясь в митохондриях с сохраненным ΔΨm. Когда ΔΨm начинает снижаться, краситель рассеивается по цитозолю клетки, в результате чего уровень флуоресценции снижается. Таким образом, TMRM удобно использовать в экспериментах для мониторинга состояния митохондрий методами лазерной сканирующей микроскопии или проточной цитометрии [108, 109]. Изменение  $\Delta \Psi$ ти и выход цитохрома С из митохондрий предшествуют активации каспазы-3, указывая на более ранние стадии апоптоза. Помимо этих критериев, для определения апоптоза довольно часто используются красители, связывающиеся с фосфатидилсерином (ФС) апоптотических клеток. Экстернализация ФС проявляется позднее вышеуказанных признаков апоптоза, однако предшествует сжатию цитоплазмы, уменьшению размеров клетки и блеббингу [110] и позволяет определить апоптоз в более ранние сроки, чем методы, основанные на фрагментации ДНК.

Одним из наиболее часто используемых красителей для маркирования экстернализации ФС является Аннексин V. Аннексин V – это Ca<sup>2+</sup> -зависимый фосфолипид-связывающий белок, который имеет высокое сродство к ФС. Он связывается с клетками, у которых ФС перестал удерживаться на внутренней поверхности плазматической мембраны и локализовался на поверхности клетки [111-113].

Аннексин V может быть конъюгирован с флуоресцентными метками, такими, как фикоэритрин (ФЭ) или изотиоцианат флуоресцеина (ФИТЦ, FITC, от англ. «fluorescein isothiocyanate»). ФЭ и ФИТЦ имеют высокое сродство к Аннексину V и служат в качестве чувствительных зондов для проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии клеток, в которых протекает апоптоз [114-116]. Окрашивание клеток Аннексином часто проводят одновременно с другими флуоресцентными красителями, имеющими сродство к ДНК, например. пропидиумом йодидом (ПИ) или 7-AAD. 7-AAD способен проникать в клетку через поврежденную мембрану и связываться с деградирующей ДНК на участках между гуанином и цитозином, что является маркером поздней стадии апоптоза, либо некроза [117]. Такое комбинирование помогает помимо экстернализации ФС также контролировать повреждения плазматической мембраны и отделить апоптоз от некроза или других видов клеточной гибели [115, 118].

Одним из поздних призаков апоптоза является фрагментация ДНК [119, 120], для обнаружения которой может быть использован метод терминальной маркировки концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы (TUNEL, от англ. «TdT-

mediated dUTP Nick End Labeling Assays»). Метод был разработан около 20 лет назад и впоследствии усовершенствован. Он основан на наличии двухцепочечных ДНК, разрывов которые можно определить при помощи дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT), катализирующей присоединение дезоксинуклеотидов, меченных флуорохромом или другими маркерами, к 3'гидроксильных концам данных двухцепочечных разрывов ДНК [121, 122]. Изначально при проведении данного анализа возникали сложности С идентификацией затем апоптоза, но появились способы. позволяющие использовать модифицированные флуорофоры или гаптены 2'-дезоксиуридин-5'трифосфата (dUTP), с использованием брома или биотина, что позволило повысить точность данного анализа [123, 124].

## 1.3 Активные формы кислорода

Активные формы кислорода представляют собой небольшие молекулы, образуемые из кислорода в ходе различных реакций. Большая часть АФК – свободные радикалы, играющие роль вторичных мессенджеров [125].

## 1.3.1 Основные типы АФК

## Источники АФК в клетке

К основным АФК относятся: супероксид анион-радикал ( $O_2^-$ ), пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), пероксидный радикал ( $HO_2^-$ ), гидроксильный радикал (OH), пероксидный ион ( $HO_2^-$ ), гипохлорит-ион ( $CIO^-$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ), озон ( $O_3$ ), оксид азота (NO). АФК подразделяются на радикальные и нерадикальные. Радикальные формы имеют один или несколько неспаренных электронов на внешней электронной оболочке. Примерами таких форм кислорода являются супероксид анион-радикал и гидроксильный радикал. Нерадикальные АФК неспаренных электронов на внешней электронной оболочке, соответственно, не имеют: например, пероксид водорода, гипохлорит.

Около 95-98% вдыхаемого человеком кислорода (O<sub>2</sub>) идет на окисление субстратов и выработку энергии, оставшиеся 2-5% O<sub>2</sub> превращаются в ходе различных реакций в АФК [126, 127]. Большая часть кислорода в клетке потребляется митохондриями, именно за счет их деятельности в клетке вырабатывается большая часть АФК [128-131].

Образование АФК происходит на митохондриальной дыхательной цепи (электронно-транспортной цепи, ЭТЦ) при 4-х электронном восстановлении O<sub>2</sub> до воды (H<sub>2</sub>O), что необходимо для производства АТФ – основной функции митохондрий [132]. Таким образом, образование АФК является важной частью функционирования клеток. Присоединение каждого последующего электрона к молекуле O<sub>2</sub> приводит к образованию новой формы АФК [128, 133].

- 1)  $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$
- 2)  $^{\circ}O_2^{-} + e^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2$
- 3)  $H_2O_2 + e^- \rightarrow OH + HO^-$
- 4) 2  $^{\circ}OH + 2 e^{-} + 2 H^{+} \rightarrow 2 H_{2}O$

Донорами электронов для цепочки данных реакций являются, как правило, металлы с переменной валентностью, например медь или железо [128]. Избыточная продукция АФК в большей степени связана с нарушением электронно-транспортной цепи митохондрий (ЭТЦ) или микросом [134]. Также этому способствуют изменение работы дегидрогеназ и низкие концентрации аденозиндифосфата АДФ. Секреция митохондриальных АФК в цитозоль контролируется большой группой белков [135]. Повышенное накопление кальция в цитоплазме отвечает за активацию митохондриальной цепи переноса электронов и за выработку АФК. Еще одним эндогенным источником АФК является цитохром Р450-зависимая микросомальная система транспорта электронов у млекопитающих [136]. Одной из наиболее изученных к настоящему моменту АФК является синглетный кислород.  ${}^{1}O_{2}$  является высокореактивной нерадикальной электрофильной молекулой, способной окислять фенолы, сульфиды, амины, быстро взаимодействовать с ненасыщенными органическими соединениями с двойной связью и т.д. [137]. В конечном итоге взаимодействие  ${}^{1}O_{2}$  с клетками приводит к перекисному окислению липидов (ПОЛ) в биомембранах с образованием гидроперекисей органических молекул [138].

В клетках  ${}^{1}O_{2}$  с эффективностью 50% может генерироваться в результате самопроизвольного разложения пероксинитрата ( $O_{2}NOO^{-}$ , продукт реакции супероксидных анионов и  $NO_{2}$ ) [139, 140]. Также он может образовываться в результате взаимодействия пероксинитрита ( $ONOO^{-}$ ) и  $H_{2}O_{2}$  [48, 141, 142], в реакциях между HOCl и  $H_{2}O_{2}$  [143, 144], между гидроперекисями липидов и HOCl/пероксинитритом [139, 145, 146], между глутатионом и супероксидным анионом [147].

В отличие от других видов АФК, являющихся продуктами реакций переноса электронов,  ${}^{1}O_{2}$  представляет собой единственный вид АФК, генерируемый при передаче энергии.  ${}^{1}O_{2}$  способен участвовать в реакциях, в которые  $O_{2}$  не вступает. Он может образовываться при передаче энергии от возбужденной молекулы фотосенсибилизатора, в свою очередь возбужденной квантом света [148-150], что используется в фотодинамической терапии как потенциальное терапевтическое средство для лечения злокачественных опухолей, а также в лечении вирусных заболеваний [150-152]. Гибель опухолевых клеток, вызванная посредством  ${}^{1}O_{2}$ , может протекать через апоптоз [151, 153].  ${}^{1}O_{2}$  участвует в различных химических реакциях с образованием других окислителей и цитотоксических молекул, способных убивать патогены и инактивировать антигены [154].  ${}^{1}O_{2}$  также является причиной фотодеградации полимеров [155].

Наиболее заметным представителем АФК является супероксид анионрадикал, являющийся продуктом одноэлектронного восстановления двухатомного кислорода. Реакционная способность данного радикала относительно низкая, но он является наиболее распространенным АФК [156]. В физиологических условиях ' $O_2^-$  может генерироваться NADPH-оксидазами [157, 158], но в основном вырабатывается митохондриальной цепью переноса электронов, в частности ее комплексами I, II и III [159], при этом только комплекс III высвобождает ' $O_2^-$  как в матрикс, так и в межмембранное пространство митохондрии [160]. В присутствии фермента супероксиддисмутазы (СОД) ' $O_2^-$  превращается в H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [161-163]. ' $O_2^-$  является источником 'OH – самого активного и реакционноспособного АФК, образуемого в ходе в реакции Хабера–Вейсса [164].

ОН' может быть причиной серьезных повреждений клеточных структур, вызывая повреждения мембран, перекисное окисление липидов, нарушение структуры белков. В клетках не существует механизма ферментативного уничтожения ОН', поэтому чрезмерные его концентрации могут привести к их гибели. Высокая реакционная способность данного радикала объясняется наличием неспаренного электрона, что позволяет активно взаимодействовать с другими молекулами [165, 166]. Помимо реакции Хабера–Вейсса, 'ОН может быть образован в реакциях взаимодействия  $H_2O_2$  с ионами переходных металлов [149, 164], а также на 3-м этапе 4-х электронного восстановлении  $O_2$  до воды [128, 133].

 $H_2O_2$  относится к нерадикальным формам АФК, обладает относительно длительным временем жизни, что позволяет ему участвовать в реакциях с биомолекулами в удалении от сайтов его образования. Этому же способствует способность  $H_2O_2$  проникать через мембраны. Такие свойства пероксида водорода способствуют его роли в качестве вторичного мессенджера для передачи каскадных сигналов [167, 168]. Наиболее значимым источником  $H_2O_2$  в клетке является  $O_2^-$ , который превращается в пероксид водорода за счет работы СОД [161, 162].

Повышение концентраций АФК в клетке может быть вызвано внешними и внутренними факторами. К внешним можно отнести: ультрафиолетовое (УФ) и ионизирующее излучения (ИИ), различные канцерогены [149]; внутренними

причинами повышения концентраций АФК может являться, например, нарушение дыхательной цепи переноса электронов в митохондриях [134].

## Клеточные мишени и функции АФК

АФК характеризуются высокой реакционной способностью по отношению к биологическим мишеням, включая липиды, белки и ДНК [169].

ΑФК Поскольки большая часть образуется в дыхательной цепи митохондрий, наиболее повреждающее действие АФК оказывают именно на мембраны митохондрий [130, 131]. Вырабатываемые за счет работы ЭТЦ, АФК [133] участвуют в передаче клеточных сигналов, связанных с выживанием и гибелью клеток, а также в контроле окислительно-восстановительного гомеостаза [170]. Под действием АФК происходит окисление SH-групп АДФ/АТФтранслоказы, в связи с чем нарушается выход АТФ из матрикса митохондрий, происходит повреждение митохондриальных мембран, открытие неспецифических пор mPTP, выход в цитозоль цитохрома С, его связывание с Apaf-1 и прокаспазой 9 с образованием апоптосомы, выход флавопротеина AIF [48, 84]. Помимо этого, АФК способствуют поступлению Ca<sup>2+</sup> из внеклеточного пространства и внутриклеточных депо в цитоплазму, также они способствуют активации кальциевых транспортеров, что приводит к проникновению Ca<sup>2+</sup> в матрикс митохондрий из цитоплазмы [171, 172]. Происходит проникновение ионов и воды в матрикс митохондрий, их набухание, разрыв внешней мембраны, выход «белков апоптоза» в цитоплазму и развитие дальнейших реакций апоптоза, ведущих к гибели клеток [83].

АФК приводят к окислению азотистых оснований, их модификации и повреждению хромосом. Поскольку множество жизненно важных белков закодированы в геноме митохондриальной ДНК (мтДНК), ее повреждения приводят к нарушению их экспрессии и функционирования клетки в целом. Если мутации накапливаются медленно и не приводят к быстрой гибели, то происходит «старение» митохондрий. Существует зависимость между уровнем АФК, эффективностью дыхания и возрастом, что легло в основу «митохондриальной

теории старения» [83, 173]. Если же изменения в митохондриях происходят относительно быстро, то они приводят к нарушению витальных функций клетки, ее злокачественному перерождению или гибели.

Радикальные формы кислорода приводят к перекисному окислению липидов [174]. В небольших концентрациях АФК участвуют в поддержании окислительновосстановительного баланса И иммунной системы [175], В различных миграция, пролиферация, физиологических процессах, таких как прогрессирование клеточного цикла и др. [176, 177]. Например, локальная продукция АФК за счет оксидазы никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH-оксидаза, NOX, от англ. «Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase») может влиять на миграцию клеток через изменения в динамике адгезии и сигнализации [177]. Однако увеличение их концентраций приводит к окислительному стрессу в клетках, нарушению физиологических функций и повреждению генома [178-180].

К настоящему моменту в ряде исследований показано, что АФК способны играть решающую роль в гибели опухолевых клеток с помощью различных механизмов, влияющих на окислительный стресс [181-183]. Высокий уровень окислительного стресса способствует гибели опухолевых клеток путем некроза или апоптоза [184, 185]. Окислительный стресс может быть причиной временной остановки клеточного роста и адаптации, способен инициировать некоторые механизмы передачи сигналов, вызывать транскрипцию генов и восстановление поврежденной ДНК [186, 187]. Разница реакций будет зависеть от генетического АФК. фона видов вызывающих окислительный клетки. стресс, продолжительности и интенсивности окислительного стресса [188, 189]. Совокупность всех факторов будет определять дальнейшую судьбу клетки: подвергнется ли она некрозу, апоптозу, старению или выживет и приступит к делению [187].

В некоторых клеточных системах уровни АФК при апоптозе изменяются при действии на них фактора некроза опухоли α (TNF-α, от англ. «tumor necrosis factor alpha»), который способен запускать митоген-активируемый протеинкиназный

каскад (МАРК, от англ. «mitogen-activated protein kinase») [190, 191]. Было показано, что АФК, накопление которых произошло посредством TNF-а, способствуют превращению каталитического цистеина инактивирующих JNK фосфатаз в сульфеновую кислоту, блокируя их действие. Активация JNK, в свою очередь, является необходимым условием для высвобождения цитохрома С, активации каспазы 3, а также развития некротической реакции [192]. Количество АФК может повышаться во время апоптоза, опосредованного TNF-α [191], также АФК являются медиаторами апоптоза лимфоцитов после таких стимулов, как Fas [193], лечение глюкокортикоидами [194] передача сигналов или химиотерапевтическими препаратами [195].

Ингибирование апоптоза через Bcl-2 связано с защитой от АФК [196]. В апоптоза изменения окислительно-восстановительного различных моделях статуса клеток в более окислительную среду происходят до начала конечной фазы активации каспазы [185, 197]. Этот случай дополнительно подтверждается способностью различных антиоксидантов, таких как N-ацетил-L-цистеин (NAC), блокировать апоптоз аналогично ингибиторам каспазы [198]. Кроме того, антиоксидантные свойства Bcl-2, мощного ингибитора апоптоза, еще раз подтверждают эту точку зрения [199, 200]. В нормальных условиях аэробные клетки наделены обширными антиоксидантными защитными механизмами для противодействия повреждающему действию АФК [201, 202]. Когда прооксиданты подавляют механизмы антиоксидантной защиты, возникает окислительный стресс. Интересно, что апоптоз может служить надежным устройством для пролиферации предотвращения неконтролируемой клеток перед лицом постоянного окислительного стресса [203].

Если контролировать уровень АФК в необходимом диапозоне, то их можно использовать для лечения опухолевых новообразований [26, 169, 177]. Для борьбы со злокачественными новообразованиями, помимо облучения, влияющего на внутриклеточные уровни АФК в опухолях [150, 151, 204, 205], также используется ряд противоопухолевых препаратов, способных изменять уровень АФК через различные механизмы [206]. Примерами таких препаратов могут

являться производные антрациклина, способные вызывать апоптоз злокачественных новообразований. Так, доксорубицин [207] и эпирубицин [208] проявляют противоопухолевую активность, вызывая повышенное образование АФК и повреждая ДНК [209, 210]. А винорелбин истощает запасы глутатиона, приводя к увеличению концентраций внутриклеточных АФК [211].

Также к противоопухолевым препаратам, способным вызывать повышенное образование АФК, относятся платиновые комплексы. Цисплатин является наиболее представителем подобных [212-219]. изученным препаратов Эффективность новых противоопухолевых препаратов, а также их механизмы действия и побочные эффекты часто сравнивают с цисплатином [220-222]. Аналогично производным антрациклина, противоопухолевый эффект при использовании платиновых комплексов связан не только с повышенным образованием АФК, но и с воздействием на цепочки ДНК. Добавление ловушек АФК при действии данных препаратов способно снизить гибель клеток и даже способствовать восстановлению двухцепоченых разрывов ДНК [222, 223].

Артесунат не является противоопухолевым препаратом, однако индуцирует апоптоз в лейкозных Т-клетках главным образом через митохондрии и генерацию АФК [224], используется для лечения тропической малярии [225].

Многие цитотоксические агенты вызывают образование АФК, в том числе  $H_2O_2$  и  $O_2^-$ , которые участвуют в индукции апоптотической гибели клеток [181, 207, 222, 223, 226].

## 1.3.2 Пероксид водорода

## Образование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетке

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> генерируется в процессе клеточной жизнедеятельности в качестве побочного продукта различных реакций, однако основная его часть образуется на дыхательной цепи митохондрий [128, 227].

Главным источником  $H_2O_2$  в клетке является  $O_2^-$ , образуемый в дыхательной цепи митохондрий и подвергающийся реакции дисмутации СОД, небольшая часть

реакций дисмутации происходит спонтанно [228, 229]:

1) 
$$2^{\circ}O_{2}^{-} + 2H_{2}O \rightarrow H_{2}O_{2} + O_{2} + 2 OH^{-};$$
  
2)  $M^{(n+1)+} - CO\mathcal{I} + {}^{\circ}O_{2}^{-} \rightarrow M^{n+} - CO\mathcal{I} + O_{2},$   
 $M^{n+} - CO\mathcal{I} + {}^{\circ}O_{2}^{-} + 2H^{+} \rightarrow M^{(n+1)+} - CO\mathcal{I} + H_{2}O_{2},$ 

где М – переходный металл: Cu (n=1); Mn (n=2); Fe (n=2); Ni (n=2) [228].

СОД имеет несколько изоформ, различающихся строением активного центра, содержащего различные типы переходного металла-кофактора: Cu,Zn-COД содержится в цитозоле (СОД1) [230] и межклеточном пространстве (СОД3) [231], Мп-СОД в митохондриях (СООД2) [232], Fe-СОД в небольшом количестве в митохондриях [233, 234]. Таким образом,  $H_2O_2$  может быть синтезирован из  $O_2^-$ : а) при помощи СОД1 в цитозоле клетки, куда 'О<sub>2</sub><sup>-</sup> экспортируется из митохондриального межмембранного пространства через потенциал-зависимые анионные каналы; б) через СОД2 в митохондриальном матриксе, где непосредственно происходит синтез  $O_2^-$  на III комплексе митохондриальной цепи [163, 201]; в) во внеклеточном пространстве с помощью СОДЗ, куда 'О<sub>2</sub><sup>-</sup> может быть транспортирован через NOX2 [162]. Поскольку СОД характеризуются как высокоэффективные ферменты, баланс смещается в сторону образования Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, который относительно свободно диффундирует или транспортируется при помощи рецепторов через биологические мембраны [235].

Другим источником 'O<sub>2</sub><sup>-</sup> для образования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> являются HAДФH-оксидазы, осуществляющие перенос электронов через биологические мембраны [157, 158].

Кроме дисмутации  $O_2^-$  пероксид водорода может образовываться в ходе отщепления ферментами атомов водорода от органических субстратов (R). До 35% вырабатываемого клетками  $H_2O_2$  образуется в пероксисомах за счет работы множества ферментов: уратоксидаз, оксидаз L- $\alpha$ -оксикислот, оксидаз D-аминокислот, глицилоксидаз, ацил-КоА-оксидаз жирных кислот и т.д.:

 $RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$ 

где R – субстрат [236, 237].

Ксантиноксидаза – молибденсодержащий фермент, встречающийся в цитоплазме некоторых клеток [238]. Во время двухэлектронного восстановления ксантиноксидазой О<sub>2</sub> также происходит образование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

гипоксантин + 
$$O_2$$
 +  $H_2O \rightarrow \kappa$ сантин +  $H_2O_2$   
ксантин + 2  $O_2$  +  $H_2O \rightarrow$  мочевая кислота + 2  $O_2^-$  + 2 $H^+$   
ксантин +  $O_2$  +  $H_2O \rightarrow$  мочевая кислота +  $H_2O_2$   
2  $O_2^-$  + 2 $H^+ \rightarrow H_2O_2$  +  $O_2$ 

Помимо этого, образование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может происходить на мембранах митохондрий при взаимодействии двухзарядного аниона кислорода и протонов [237]:

 $O_2^{2^-} + 2H^+ \to H_2O_2$ 

## Диффузия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> через мембраны

 $H_2O_2$  является менее реакционноспособной АФК, чем  $O_2^-$  и OH, он не является радикалом и относительно легко проникает через клеточные мембраны. Перемещается данная молекула через мембраны с различными константами скорости проникновения, так, скорость его диффузии через плазматическую мембрану составляет от 0,01 до 0,7 см/мин [239]. Существуют работы, указывающие, что некоторые мембраны хуже проницаемы для пероксида водорода, чем другие [239-242], что указывает на возможность клетки контролировать трансмембранную диффузию. На проникновение  $H_2O_2$  сквозь мембрану может влиять осмотическое растяжение самой мембраны, облегчающее диффузию [243], а также состав мембраны – разница в липидных и/или белковых образующих ее компонентах [242].

Показано, что важную роль в диффузии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> через мембраны играют аквапорины. Известно, что аквапорин 8, в отличие от аквапорина 1, облегчает его транспорт через мембраны [244-246].

Эти свойства делают H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> удобной молекулой для участия в различных клеточных сигналах, поэтому многие исследователи рассматривают его в качестве вторичного мессенджера [22-24].

#### Роль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в нормальных и опухолевых клетках

К настоящему моменту накопилось множество сведений  $H_2O_2$ 0 показывающих, что его роль в жизнедеятельности клеток неоднозначна. Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub> способствует повышенному ангиогенезу [14, 15], может принимать участие в реакциях, приводящих к клеточной пролиферации, а также миграции клеток [10-13, 247, 248]. Он также способен вызывать повреждения ДНК и мутации [249-251], трансформации приводить к злокачественной И способствовать метастазированию рака [19-21, 252]. Помимо этого есть сведения, указывающее на его участие в передаче апоптозного [16-18, 253, 254], а также некрозного [255, 256] сигналов.

Показано, что на одну и ту же культуру клеток пероксид водорода может оказывать разное воздействие. Так, добавление  $H_2O_2$  в небольших концентрациях к клеткам ВНК-21, а также к клеткам рака простаты человека способно привести к увеличению пролиферации, а в высоких концентрациях вызывать торможение роста, остновку клеточного цикла и/или апоптоз [257, 258]. Разница в достигаемых эффектах определяется состоянием клетки, её окружением, временем воздействия, а также локальной концентрацией  $H_2O_2$  [8, 259].

Нужно отметить, что концентрации  $H_2O_2$  играют одно из решающих значений при выборе клеткой дальнейшей стратегии поведения [22] (рисунок 1). В интервале концентраций от 1 нМ до 0.1–0.5 мкМ, соответствующем физиологичному состоянию клетки,  $H_2O_2$  играет роль сигнальной молекулы, в концентрациях от 1 мкМ до 10 мкМ он способен вызвать остановку клеточного цикла и окислительный стресс, к которому клетка может адаптироваться и продолжить делиться в дальнейшем, а при концентрации свыше 10 мкМ окислительный стресс будет слишком высоким, клетка потеряет способность адаптироваться и подвергнется апоптозу [22]. Однако данные границы весьма условны и сильно зависят от типа клеток, распределения  $H_2O_2$  внутри клетки, условий культивирования и т.д.



Рисунок 1. Различные клеточные эффекты H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [22] с изменениями

Существуют данные об особенностях образования и утилизации пероксида водорода в нормальных и опухолевых клетках. Продукция H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> посредством СОД2 участвует в регулировании экспрессии ММР, инвазии опухоли и ее метастазировании, а опухоли с повышенным содержанием СОД2 могут быть устойчивы к химио- и лучевой терапии [20]. С другой стороны, для ряда опухолей продемонстрирована повышенная экспрессия ферментов антиоксидантной защиты, таких, как каталаза, ГП и пероксиредоксины [260, 261].

Нормальные и опухолевые клетки обладают разной чувствительность по отношению к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: опухолевые клетки обладают повышенной восприимчивостью, а определенные концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> способны вызывать гибель опухолевых, но не нормальных клеток [22, 26, 27] (рисунок 2). Это обусловлено повышенной метаболической активностью опухолевых клеток, что

приводит к изменениям окислительно-восстановительного состояния и способствует образованию высоких уровней АФК [169].



Рисунок 2. Избирательная гибель опухолевых клеток при воздействии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, адаптировано из [26]

Повышенный уровень  $A\Phi K$ , в том числе и  $H_2O_2$ , в опухолевых клетках может быть использован в качестве метода их селективного уничтожения при помощи химиотерапевтических препаратов, а также способствовать борьбе с устойчивостью опухолевых клеток к их воздействию [28, 29]. Существуют противоопухолевые препараты, обеспечивающие образование  $H_2O_2$  [262, 263].

#### Клеточные мишени H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Среди многочисленных внутриклеточных мишеней H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> важной функцией во внутриклеточной сигнализации обладают редокс-чувствительные белки, содержащие в боковых цепях сульфгидрильные или тиоловые группы (SH) [264, 265]. В физиологичных условиях тиоловые группы белков окисляются с образованием сульфеновой кислоты (RSOH), а также с образованием внутри- и межмолекулярных S-S мостиков белковых молекул, что непосредственно выражается в конформационных изменениях в структуре белков [266]. Окислительно-восстановительные превращения тиольных групп в белках являются обратимыми [267], что является важным условием соблюдения окислительно-восстановительного баланса в клетке и может использоваться для определения внутриклеточных концентраций H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [268].

Ферменты, способствующие разложению H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> могут приводить к быстрому снижению его уровня [235], что вызывает образование градиентов концентрации ферментов в определенных локусах клетки, а инактивация данных В определенных клеточных областях может приводить к окислению специфических тиолов в целевых белках [269, 270]. Тиоловые группы пероксиредоксинов способны окисляться даже при относительно низких концентрациях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [271, 272], однако макромолекулы требуют больших концентраций H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Окисляя каталитический цистеин МАРК фосфатаз, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> приводит к их инактивации, что вызывает активацию JNK и p38 MAPK. Активация JNK, в свою очередь, приводит к развитию апоптоза через активацию каспазы 3 и выход цитохрома С, также это может приводить к развитию некротической реакции [192]. JNK изменяет активность множества митохондриальных и ядерных белков, регулируя рост, миграцию, пролиферацию и выживание или апоптоз клеток [273-275]. Активация р38 МАРК способствует повышению активности фактора транскрипции NF-кВ, что может обеспечивать выживание и метастазирование раковых клеток [276].

Таким образом, через H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> можно как контролировать селективную, локализованную передачу сигнала, так и способствовать общей клеточной реакции.

Существуют противоречивые сведения о роли  $H_2O_2$  в механизме апоптоза. Многие цитотоксические препараты индуцируют АФК, в том числе пероксид водорода, вызывая апоптоз опухолевых клеток [226]. Известно, что остатки цистеина в каталитическом сайте капсаз способны подвергаться глутатиолизации, нитрозированию или окислению, что является необходимым условием окислительно-восстановительного механизма контроля каспазной активности
[277]. Показано, что вызванная Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub> инактивация каспазы 9 связана с окислением цистеина каталитического сайта прокаспазы 9 и приводит к ингибированию апоптоза [278]. Также экзогенное или эндогенное повышение уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывает обратимую инактивацию каспазы 3 и каспазы 8 путем окисления цистеинов их каталитических центров [279]. В тоже время, существуют сведения, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может способствовать высвобождению цитохрома С из митохондрий в цитозоль, активировать ядерные факторы транскрипции, такие как NF-кB, AP-1 и р53 [280], что может привести к повышенной регуляции белков смерти или ингибиторов белков выживания. Некоторые продукции исследования предполагают, что ингибирование апоптоза Bcl-2 связано с защитой от АФК [196]. Вероятно, вызываемые H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> эффекты зависят от его концентрации и локализации внутри клетки [22].

# 1.3.3 Защита клетки от АФК

Для защиты от АФК в клетке задействуются несколько систем антиоксидантной защиты (AO3), которые можно разделить на антиоксидантные ферменты и неферментные молекулы. Данные вещества всегда присутствуют в клетке, поддерживая клеточный баланс и защищая клетку от окислительного стресса [281]. Равновесие между скоростями образования оксидантов и их обезвреживанием антиоксидантными системами носит название окислительновосстановительного баланса или редокс-статуса [282].

#### Системы антиоксидантной защиты

СОД представляют собой ферменты, при помощи которых осуществляется реакция дисмутации  $O_2^-$  в H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [161-163]. СОД встречаются как у прокариот, так и у эукариот [283]. Изоформы СОД в качестве кофактора в активном центре содержат различные ионы переходных металлов: цинка и меди, марганца, железа, а также расположены в разных компартментах клетки, что связано со спецификой в регулировании биологических реакций [230-234]. СОД1 содержит в активном

центре медь и цинк и встречается в цитозоле эукариотических клеток [230, 284, 285]. В структуру СОДЗ также входят ионы цинка и меди, однако для него характерна локализация не внутри клетки, а в межмембранном пространстве [231]. В активном центре СОД2 расположен марганец, внутри клетки данная суперооксиддисмутаза локализуется внутри митохондрий [232]. Также в митохондриях можно встретить железосодержащую СОД [233, 234]. Для прокариот характерны марганцевая и железосодержащие СОД [286, 287].

Каталазы расходуют H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, образованный другими ферментами, для окисления множества субстратов с образованием воды:

 $H_2O_2 + RH_2 \rightarrow R + 2H_2O$ 

где R – субстрат. Субстратами каталазы в данных реакциях могут быть фенолы, формальдегиды, спирты и другие вещества. Также при накоплении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> под воздействием каталазы происходит его распад [234, 288, 289]:

 $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ 

В основном каталаза у эукариот локализована в цитозоле и пероксисомах [290-292].

Пероксиредоксины (Prx, от англ. «Peroxiredoxin») – тиоредоксиновые пероксидазы, локализующиеся в митохондриях, цитозоле, ядре и способствующие восстановлению органических гидропероксидов,  $O_2NOO^-$ , а также  $H_2O_2$  [270, 293, 294]. В активном центре Prx содержатся цистеиновые остатки и, в зависимости от них, Prx можно разделить на три класса: типичные 2-Cys пероксиредоксины (PrxI-IV), атипичные 2-Cys пероксиредоксины (PrxV) и 1-Cys пероксиредоксины, (PrxVI) [270]. Показано, что у мышей с нокаутом PrxI выявляется повышенный уровень окислительного стресса, при этом они умирают от рака [295]. Работа Prx происходит при окислении тиоловой группы редоксактивного цистеина с образованием сульфеновой кислоты в активном центре [266].

Тиоредоксиновая система АОЗ представлена тиоредоксином и тиоредоксинредуктазой. Каталитический центр тиоредоксина содержит два соседних цистеина, поэтому он взаимодействует с другими белками по типу тиолдисульфидного обмена [296, 297]. Таким образом, тиоредоксин способствует сохранению восстановленной формы белков, а также способен поглощать АФК [45]. Тиоредоксинредуктазы, в свою очередь, способствуют регенерации тиоредоксина, используя НАДФН в качестве донора электронов [46].

Система глутатиона включает в себя глутатион (GSH), глутатионредуктазу (Grx), глутатионпероксидазы (GP) и глутатион-S-трансферазы (GST). Глутатионпероксидаза способствует утилизации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и органических пероксидов с участием глутатиона, глутатион при этом подвергается окислению [288, 298]:

 $2 GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2 H_2O$ 

 $2 GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$ 

Более 70% GP локализуется в цитозоле, 25-30% - в матриксе митохондрий, сродство к пероксиду водорода у нее выше, чем у каталазы, поэтому она эффективна даже при низких его концентрациях. GSH восстанавливает дисульфидные связи цитоплазматических белков, окисляясь до дисульфида глутатиона (GSSG). Grx активно восстанавливает GSSG, способствуя поддержанию определенного уровня GSH, благодаря чему клетке в В физиологичных условиях глутатион почти полностью восстановлен [299, 300]. GST обнаруживаются в большой концентрации в опухолях, способствует соединению глутатиона с электрофильными соединениями [301, 302].

# Активация антиоксидантной защиты пероксидом водорода

Окисление пероксидом водорода тиоловых групп белков может приводить к активации антиоксидантной защиты клетки [227, 303]. Запуск антиоксидантной защиты может быть связан с работой транскрипционного ядерного фактора 2, связанного с эритроидным фактором 2 (Nrf2, от англ. «Nuclear factor erythroid 2-related factor 2») [303]. Nrf2 регулирует экспрессию антиоксидантных белков, защищающих клетку от окислительного повреждения [304]. Подавление Nrf2 осуществляется Kelch-подобным белком 1, ассоциированным с ECH (Keap1, от англ. «Kelch-like ECH-associated protein 1»). Кеар1 содержит в своем составе остатки цистеина, с которыми происходит связывание убиквитина, формирование

убиквитин-лигазного комплекса rbx1 E3 [305] и дальнейшая протеосомная деградация. Окисление тиоловых групп остатков цистеина приводит К конформационным изменениям Keap1 и может служить маркером окислительного Keap1 стресса [306]. Конформационные изменения препятствуют убиквитинированию Nrf2 и предотвращают его деградацию протеосомами, в результате чего происходит его накопление в ядре и связывание с промоторным регионом гена элемента антиоксидантного отклика (ARE, от англ. «anti-oxidant response element»), приводя к активации транскрипции антиоксидантных белков. Непрерывное накопление Nrf2 в ядрах некоторых раковых клеток может быть вызвано мутациями Keap1, связанными с его инактивацией, эпигенетическим молчанием Keap1, а также мутациями онкогенов (K-ras, B-raf и с-myc,), приводящими к онкоген-опосредованной активации транскрипции Nrf2 [227].

Из многочисленных генов-мишеней Nrf2 можно выделить гены каталитической и регуляторной субъединицы глутамат-цистеинлигазы – важного фермента биосинтеза глутатиона, способствующего превращению L-глутамата и L-цистеин при участии АТФ в гамма-глутамил цистеин [307, 308].

Активация Nrf2 также может приводить к индукции глутатион-S-трансфераз, катализирующих конъюгацию глутатиона (GSH) с эндогенными и ксенобиотическими электрофилами [309].

Помимо этого Nrf2 влияет на сульфиредоксин 1 и тиоредоксинредуктазу 1, которые в свою очередь способствуют восстановлению пероксиредоксинов, инактивирующих АФК, в том числе  $O_2NOO^-$ и  $H_2O_2$  [310, 311]. Сульфиредоксин участвует в антиоксидантном метаболизме, способствуя повторной активации пероксиредоксинов, ингибированных избыточным окислением [312], тиоредоксин способствует восстановлению других белков за счет тиол-дисульфидного обмена цистеина [313, 314].

Еще одной мишенью Nrf2 являются гены НАД(Ф)Н-хинон-оксидоредуктазы 1, катализирующей детоксикацию хинонов [315], обеспечивая полное окисление субстрата без образования АФК и семихинонов. Восстановленные НАД(Ф)Н - хинон-оксидоредуктазой 1 убихинон и хинон витамина Е способствуют защите клетки от ПОЛ [316].

# 1.3.4 Способы определения АФК в клетке

Существуют способы прямого и косвенного обнаружения АФК. Косвенное обнаружение АФК осуществляется путем количественного определения продуктов их реакций. Способы прямого анализа позволяют непосредственно определить количество одного или нескольких видов АФК в исследуемой среде.

Для обнаружения АФК используются разнообразные методы исследования: электронно-парамагнитный резонанс (ЭПР), электронно-спиновой резонанс, ядерно-магнитный резонанс, высокоэффективная жидкостная хроматография, люминометрия, масс-спектрометрия, иммунохимия, вестерн-блоттинг. микроскопия, проточная цитометрия и т.д. Большинство методов предполагает их использование в сочетании с зондом, обладающим определенными свойствами. К настоящему моменту разработано большое разнообразие зондов, среди которых можно выделить спиновые ловушки, хемилюминесцентные зонды, флуоресцентные красители, генетически-кодируемыми сенсоры и т.д. [317].

#### Спиновые ловушки

Спиновые ловушки (СЛ) используются для обнаружения свободных радикалов методом ЭПР. СЛ связываются с продуктами распада свободных радикалов, в результате чего образуются более стабильные аддукты [318]. Чаще всего используются 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид (ДПО) или N-трет-бутил- $\alpha$ -фенилнитрон, также в качестве СЛ могут использоваться нитрозосоединения, например 2-метил-2-нитрозопропан и 3,5-дибром-4-нитрозобензолсульфокислота, которые применяются для обнаружения 'O<sub>2</sub><sup>-</sup> в митохондриях [317]. Наиболее стабильным и доступным на данный момент из аддуктов связывания СЛ со свободными радикалами считается 5-диэтоксифосфорил-5-метил-1-пирролин-N-

оксид – зонд, полученный путем замены метильной группы в ДПО на диэтоксифосфорил [319]. Последующее введение дополнительных метильных групп в ДПО ведет к увеличению стабильности получаемых аддуктов [320, 321]. Несмотря на развитие других методов, СЛ и их производные по-прежнему используются для изучения АФК [322, 323].

# Спектрофотометрические зонды

Данные зонды обладают способностью изменять свои спектральные свойства при взаимодействии с АФК, что позволяет использовать их в различных методах исследования [317].

Для определения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> часто используют феноловый красный, однако изменения его цвета зависят от рН среды [324, 325], что не всегда напрямую связано с изменением уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Таким образом, при использовании данного метода необходимо производить контроль изменения рН. Однако данный способ был широко распространен, как относительно простой и быстрый. Еще одним распространенным способом является проведение колориметрических тестов с использованием солей тетразолия. Для обнаружения 'О<sub>2</sub>- часто используется нитросиний тетразолиум хлорид (HTX). Взаимодействие 'O<sub>2</sub><sup>-</sup> с HTX приводит к образованию нерастворимого формазана [326, 327]. Однако НТХ может быть восстановлен глутатионом или НАДФН-оксидазами, что затрудняет достоверную интерпретацию результатов [317]. Также часто используемым соединением является 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ), он, как и НТХ, способен преобразовываться в кристаллы формазана [328, 329]. МТТ также используется для обнаружения  $O_2^-$ , помимо этого используется в простых тестах на жизнеспособность клеточных культур при различных воздействиях Еще один способ измерить 'О<sub>2</sub><sup>-</sup> построен на его способности [329]. восстанавливать цитохром С [330], что приводит к увеличению поглощения света на 550 нм [331-333]. Добавление СОД, катализирующей дисмутацию 'О<sub>2</sub><sup>-</sup> [334, 335], а также стауроспорина и дифенилениодония хлорида приводило к снижению сигнала, что подтверждало специфичность реакции [334].

#### Хемилюминесцентные зонды

К настоящему моменту существует большое разнообразие хемилюминесцентных зондов, чаще остальных используются люцигенин, люминол, изолюминол, L-012 и ципридин.

Самым популярным из используемых красителей для обнаружения АФК приобретающий хемилюминесцентные свойства является люминол, В присутствии окислителей. Люминол часто используется для обнаружения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в присутствии катализаторов, например, солей железа, меди, цианидов [336]. В результате депротонирования молекулы люминола в щелочной среде происходит образование дианиона, окисление которого пероксидом водорода через ряд короткоживущих промежуточных состояний ведет к отщеплению азота и образованию возбужденной молекулы 3-аминофталевой кислоты. Переход последней в основное состояние сопровождается излучением кванта света [337]. Существует ряд работ, показывающих, что люминол окисляется 'О<sub>2</sub><sup>-</sup> или 'ОН [338-340]. Также данный краситель позволяет обнаружить продукцию HOCl, помимо этого есть сведения, что, возможно, хемилюминесценция возникает при воздействии ONOO, а не 'OH [341, 342]. Существуют работы, указывающие на важность НАДФН-оксидазы для хемилюминесценции люминола [343, 344]. Люминол способен диффундировать через биологические мембраны благодаря своему небольшому размеру, что позволяет использовать его для исследования не только внеклеточных, но и внутриклеточных АФК [345, 346].

Люцигенин – ароматическое соединение, используемое, как правило, для обнаружения  $O_2^-$ .  $O_2^-$  способен восстанавливать люцигенин с образованием нестабильного диоксетана, который самопроизвольно расщепляется с образованием N-метилакридона в возбужденном состоянии, что приводит к хемилюминесценции [347, 348]. Специфичность люцигенина к  $O_2^-$  была подтверждена в экспериментах с бесклеточными системами и при сопоставлении кинетики восстановления цитохрома С и люцигенин-усиленной хемилюминесценции [349, 350]. Количество  $O_2^-$ , определенное при помощи хемилюминесценции люцигенина, может быть несколько завышено, поскольку его радикал может

вступать в реакцию с кислородом с образованием  $O_2^-$  [347, 351], однако вклад, вносимый такой реакцией незначителен [347, 348]. Также было показано, что люцигенин не реагирует с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH, пероксинитритом (ONOO<sup>-</sup>) и радикалом оксида азота ('NO) [352, 353]. Люцигенин не проникает в клетки [354, 355], что ограничивает его использование в экспериментах. Однако люцигенин используется в сочетании с другими методами для обнаружения различных веществ, например, описан метод определения пиридоксаль-5'-фосфата на основе его реакции с люцигенином, вызывающей интенсивную хемилюминесценцию [356].

Изолюминол хемилюминесцентный краситель, отличающийся — OT люминола положением аминогруппы во фталатном кольце молекулы, что делает его менее липофильным и затрудняет его проникновение сквозь биологические мембраны [343, 345, 346]. Ограничение трансмембранного перемещения блокадой изолюминола было подтверждено его хемилюминесценции внеклеточными акцепторами, а также его неспособностью ингибировать НАДФНоксидазы [345, 346, 357]. Следовательно, изолюминол позволяет обнаружить АФК во внеклеточном пространстве [355]. Было выдвинуто предположение, что изолюминол позволяет определить выход 'О<sub>2</sub><sup>-</sup> из клетки [346]. Таким образом, для обнаружения АФК как во внеклеточном, так и во внутриклеточном пространстве можно использовать сочетание люминола и изолюминола [345, 357].

8-амино-5-хлор-7-фенилпиридо[3,4-d]пиридазин-1,4(2H,3H)дион(L-012) представляет собой высокочувствительный хемилюминесцентный зонд на основе люминола. Данный зонд обладает гораздо большей хемилюминесценцией, чем люминол и подобные ему зонды, что сделало его популярным среди исследователей [358, 359]. L-012 используется для обнаружения различных форм АФК, таких как 'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ONOO<sup>-</sup>, 'NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [360-363]. Возможность окисления данного зонда 'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 'OH и/или их метаболитами подтверждается отсутствием хемилюминесценции при добавлении СОД или каталазы, а также мочевой кислоты, хелаторов железа и поглотителей 'OH [364]. L-012 может использоваться для обнаружения АФК в цельной крови [364]. Ципридин – аналог люциферина, используется для внеклеточного обнаружения  $O_2^-$  [15, 365-368]. Реакция данного зонда требует тщательного контроля pH среды, влияющей на интенсивность его люминесценции [369]. Добавление каталазы никак не влияет на свечение ципридина, указывая на его нечувствительность к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [365, 368]. В то же время, хемилюминесценция ингибируется добавлением СОД и дифенилениодония хлорида, что подтверждает окисление ципридина  $O_2^-$  [335, 365, 368].

#### Флуоресцентные зонды

#### Флуоресцентные органические красители

К настоящему моменту разработано множество флуоресцентных красителей, позволяющих отслеживать изменение уровней АФК. Эти зонды обладают более высокой чувствительностью, чем описанные выше, поэтому все чаще используются в исследованиях.

К наиболее распространенным относится DCFH-DA. После проникновения в клетку DCFH-DA деацетилируется клеточными эстеразами, превращаясь в 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин (DCFH, «2′.7′соединение от англ. Dichlorodihydrofluorescein»), несущий отрицательный заряд. Ранее считалось, что за счет отрицательного заряда выход DCFH через плазматическую мембрану клетки затруднен, что приводит к его внутриклеточному накоплению [370]. Однако было показано, что культивируемые эндотелиальные клетки аорты не DCFH, способны удерживать как образуемый при его окислении И дихлорфлуоресцеин (DCF, от англ. «Dichlorfluorescein»), что предполагает наличие иного, либо дополнительного механизма удержания красителя в клетке [371]. DCFH, также, DCFH-DA, является нефлуоресцирующим как И соединением, однако при взаимодействии с АФК он превращается BO флуоресцирующий DCF [372, 373]. DCFH также способен окисляться активными редокс-металлами, например Fe<sup>2+</sup> в присутствии кислорода [374]. Ранее DCFH использовался для обнаружения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в присутствии пероксидазы [375], однако позже было показано, что он способен окисляться и другими молекулами, например,  $O_2$  или NO, но наиболее всего чувствителен к ONOO<sup>-</sup> [371-373, 376]. Также есть предположение, что с  $H_2O_2$  DCFH непосредственно не реагирует. Тем не менее, промежуточный радикал 'DFC <sup>-</sup> быстро реагирует с  $O_2$  с образованием супероксида ' $O_2^-$ , чья дисмутация, в свою очередь, приводит к образованию  $H_2O_2$ [377]. Существует гипотеза, что для флуоресценции DCF требуется одновременное присутствие в цитозоле либо DCFH,  $H_2O_2$  и Fe (II), либо DCFH и цитохрома C [378]. За счет своих флуоресцентных свойств DCF может быть обнаружен методами проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии [107, 353, 379-382].

Дигидрородамин 123 – флуоресцентный краситель, аналог DCFH-DA [380], легко проникает через мембраны за счет своей липофильности [383, 384]. При окислении превращается во флуоресцирующее соединение родамин 123, которое связывается с клеточными мембранами [383]. Используется для определения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетке, окисление происходит в присутствии пероксидаз [385]. Однако окисление дигидрородамина 123 также может происходить с участием цитохрома C, ONOO<sup>-</sup>, HOCl, а также некоторых других соединений [342, 383, 386].

N-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин (коммерческое название «Amplex red», AR) является высоко чувствительным специфичным зондом для определения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [387-389]. Продукт взаимодействия AR с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> обладает интенсивной флуоресценцией, реакция протекает в присутствии пероксидазы хрена [386, 389]. Стехиометрия AR с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в данной реакции составляет 1:1 [389].

Помимо AR, для определения AФК также используются другие производные флуоресцеина, например, 2-[6-(4'-гидрокси)фенокси-3H-ксантен-3-он-9-ил] бензойная кислота или 2- [6- (4'-амино) фенокси-3H-ксантен-3-он-9-ил] бензойная кислота [390]. При окислении ONOO<sup>-</sup> и 'OH эти нефлуоресцентные соединения превращаются во флуоресцеин, при этом показано, что они не способны реагировать с  $H_2O_2$ ,  ${}^1O_2$ , ON<sup>+</sup>,  ${}^*O_2^-$ , ROO<sup>+</sup> [390, 391].

Некоторые флуоресцентные красители используются для «отрицательной» пробы, т.е. их флуоресценция снижается в присутствии АФК. Примером таких

красителей может быть скополетин, флуоресценция которого снижается в присутствии пероксида водорода [392]. Скополетин является субстратом для пероксидаз [386, 393] его специфичность к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> подтверждается ингибированием реакции добавлением каталазы [388].

# Флуоресцентные белки

Среди всего разнообразия флуоресцентных зондов особенно выделяются белки, подобные зеленому флуоресцентному белку, или GFP-подобные белки (от англ. «green fluorescent protein», GFP). Зеленый флуоресцентный белок был выделен из медузы Aequorea victoria и затем получил широкое распространение в флуоресцирующей метки [394]. Путем внесения GFP в цитозоль виде плазмиднесущей кишечной палочки E.coli был сконструирован HOC1чувствительный бактериальный зонд. При взаимодействии выделенного GFP с HOCl, ONOOH и 'NO<sub>2</sub> происходит гашение его флуоресценции [395]. Как было показано, больший вклад в данную реакцию вносил HOCl. Потеря флуоресценции GFP также могла быть вызвана хлораминами.

К настоящему времени создано несколько генетически-кодируемых сенсоров АФК на основе флуоресцентных белков. Одним из значимых событий, позволяющих изучить функции  $H_2O_2$ , является открытие транскрипционного фактора OxyR (от англ. «Oxidation response», оксидантный отклик), запускающего в условиях окислительного стресса экспрессию генов антиоксидантных ферментов в бактериальных клетках [396]. Тиоловая группа в составе OxyR окисляется с образованием внутримолекулярного дисульфида в положениях C199 и C208, приводя к конформационным изменениям белка и его активации. Данные свойства OxyR позволили считать его рецептором  $H_2O_2$  и использовать для конструкции пероксид-чувствительных флуоресцентных сенсоров [89, 397-399].

Широкое распространение в настоящее время получило семейство H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>чувствительных сенсоров HyPer [398]. Отличительной особенностью сенсоров является обратимость их реакции, при этом динамика изменения содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может быть зарегистрирована не только на уровне отдельного компартмента, но и на уровне целого организма.

Сенсор HyPer представляет собой химерный белок, имеющий в своем составе чувствительный домен – домен транскипционного фактора OxyR, выделенного из *Е. coli*, и флуоресцентный домен – круговой пермутант желтого флуоресцентного белка. Сенсор имеет 2 пика возбуждения: 420 нм и 500 нм, а также один пик флуоресценции. Увеличение пика в спектре возбуждения на 400-450 нм пропорционально увеличению пика на 450-510 нм при повышении уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, что позволяет использовать сенсор как ратиометрический [397]. В настоящее время существует несколько модификаций сенсора HyPer [398]: HyPer2 обладающий увеличенным динамический диапазоном [400], HyPer3 – имеющий ускоренный отклик в сравнении с предыдущими версиями сенсора [401], HyPer-Red – флуоресцирующий в красной, а не зеленой области спектра [402], SypHer – потерявший чувствительность к изменениям H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, однако, как и все GFP-белки, обладающий рН-чувствительностью, что позволяет использовать его в качестве контроля pH при работе с сенсором HyPer [403] и т.д. Сенсоры типа HyPer были использованы в работах по изучению уровня пероксида водорода в опухолевых клетках при воздействии факторов роста [404], химиотерапевтических препаратов [405-409], фотодинамической терапии [410], индуктора апоптоза стауроспорина [411], озонирования [412], а также в инсулин-продуцирующих клетках [413], в грибке риса [414], в тканях личинок рыбок данио после ранения [415].

#### 1.4 Цисплатин

Цисплатин – противоопухолевый цитостатик, относящийся к группе платиносодержащих препаратов. Цитостатический эффект платиносодержащих препаратов был открыт Барнеттом Розенбергом и его коллегами в 1965 году при изучении влияния электромагнитного поля на рост бактериальных клеток. В ходе обнаружился неожиданный результат: эксперимента при попадании В электрическое поле наблюдалось ингибирование роста бактерий, вызванное использованием платинового электрода в эксперименте [416, 417]. В 1969 году была показана способность препарата излечивать солидные опухоли, в 1978 году цисплатин был одобрен «Управлением по контролю над продуктами и лекарствами» США (FDA), с тех пор и по настоящее время используется для лечения широкого ряда опухолей.

Цисплатин представляет собой плоский координационный комплекс цис-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], в котором два сходных лиганда находятся в соседних положениях [418] (рисунок 3).

 $\frac{CI}{CI} \sim \frac{Pt}{NH_3}$ 

Рисунок 3. Структурная формула цисплатина

Цисплатин обладает 100% биодоступностью, неферментативно превращается в организме в неактивные метаболиты. Связывание с белками плазмы превышает 95%, из организма выводится почками. Через гемато-энцефалический барьер проникает плохо, в связи с чем не может использоваться в качестве препарата при лечении опухолей мозга.

#### 1.4.1 Основное действие цисплатина, сигнальные каскады

# Проникновение цисплатина в клетку

Цисплатин способен проникать в клетку как пассивно [419, 420], так и путем активного транспорта при помощи некоторых транспортеров, в том числе Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>– АТФазы [421], высокоаффинных транспортеров меди 1 (CTR1, от англ. «copper transporter-1») [422, 423], а также при помощи транспортеров растворенных веществ [424, 425]. Устойчивость некоторых опухолевых клеток к цисплатину связана со сниженным его накоплением в клетках, пониженным содержанием СTR1 и/или повышенным содержанием экспортеров меди [426-429]. Также показано, что транспортеры меди 2 (CTR2, от англ. «copper transporter-2») способны ограничивать накопление цисплатина [214].

Экспортеры меди АТР7А и АТР7В способствуют повышению устойчивости культур к действию цисплатина [427, 429-431], при этом АТР7А способен изолировать платиновые комплексы во внутриклеточных компартментах, препятствуя их взаимодействию с ядерной ДНК [432].

При проникновении цисплатина в клетку, атом платины хелатируется GSH, после чего с помощью семейства транспортеров глутатиона комплекс GSH–Pt выводится из клетки [433]. Несмотря на то, что в некоторых клетках повышенное содержание GSH сочетается с устойчивостью к действию цисплатина [434], прямой взаимосвязи между ними, вероятнее всего, не существует [435, 436].

#### Внутриклеточные мишени

При попадании в клетку цисплатин гидролизуется с отщеплением атомов положительно заряженный способный хлора, превращаясь В ИОН, взаимодействовать нуклеофильными с участками биомолекул. Его внутриклеточными мишенями становятся белки, содержащие тиольные группы, РНК, ДНК. Цисплатин двухступенчато превращается в активную форму. На первом этапе он тормозит синтез ДНК, РНК и белка, а на втором образует метаболические продукты, действующие только на синтез ДНК. Комплексы платины с цис-расположением атомов галогенов могут образовывать устойчивые хелаты с пуриновыми и пиримидиновыми компонентами молекулы нуклеиновых кислот и таким путем формировать связи внутри одной нити или параллельных нитей двойной спирали ДНК [218]. Бифункциональное связывание нитей ДНК цисплатином, приводящее к подавлению синтеза нуклеиновых кислот и последующей гибели действиями бифункциональных клетки, схоже с алкилирующих агентов, что послужило причиной причисления цисплатина к фармакологической группе «алкилирующие средства».

Известно, что основной мишенью цисплатина являются гуаниновые и адениновые азотистые основания нитей ДНК (рисунок 4) [437], однако во фракции ДНК обнаруживается лишь 5-10% его внутриклеточной концентрации, а 75-80% связывается с нуклеофильными участками внутриклеточных компонентов, такими, как пептиды, белки, ферменты, РНК и т.д. [438-440].



Рисунок 4. Формирование аддуктов ДНК при воздействии цисплатина [440]. Цисплатин связывается с гуаниновыми и адениновыми азотистыми основаниями нитей ДНК

Цисплатин и другие платиновые комплексы способны вызывать остановку клеточного цикла [441-445]. Остановка в фазах G1 и G2 происходит в случае повреждения ДНК, в фазе S – при ошибках репликации ДНК, в М-фазе – при ошибках в сборке митотического веретена деления [442]. При остановке

клеточного цикла в контрольной точке клетка исправляет обнаруженный дефект либо, в случае невозможности исправления, подвергается апоптозу. Существует 2 контрольные точки клеточном цикле. позволяющие восстановить В поврежденную ДНК: контрольная G1-S позволяет точка восстановить поврежденную ДНК до начала репликации, а G2-М позволяет восстановить ДНК, поврежденную во время S или G2 фазы [443].

Платиновые комплексы, включая цисплатин. способны вызывать ингибирование синтеза и восстановления ДНК, остановку клеточного цикла в фазе G1, S или G2-M, что может привести к индукции апоптоза [444]. Вероятно, необходимой фазе G2 является для остановка В запуска цисплатининдуцированной гибели [446]. В то же время, существуют данные, что воздействие цисплатином, по-видимому, не способно вызвать остановку на фазе G1, даже при условии стимулирования p53 и способности вызывать остановку в S-фазе у синхронизированных клеток МЕГ дикого типа [441]. У клеточной линии HL-60 небольшие концентрации цисплатина способны вызывать остановку/арест в контрольных точках в пре-G1, S или G2 фазах, увеличение дозы цисплатина и времени воздействия приводит к задержке большего количества клеток в пре-G1 фазе [445].

Аддукты ДНК ΜΟΓΥΤ быть восстановлены белками ДНК-зависимых протеинкиназ, белками системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR, от англ. «mismatch repair»), а также белками репарации эксцизионной репарации нуклеотидов (NER, от англ. «nucleotide excision repair proteins») [438, 447]. Показано, что концентрация данных белков в опухоли может обусловливать ее устойчивость к действию цисплатина [215, 448-450]. Помимо ДНК, цисплатин способен напрямую связываться с убиквитином, участвующим в деградации короткоживущих клеточных белков. Этот процесс может быть одним из возможных сигнальных событий, запускающих цепочку реакций, ведущих к ПКГ при воздействии цисплатина [451, 452]. Также показана возможность связывания цисплатином теломеразы, что приводит к нарушению восстановления концов эукариотических хромосом [215, 453].

Кроме ДНК, убиквитина и теломеразы, мишенями для цисплатина могут являться глутатион, металлотионеины, супероксиддисмутаза, лизоцим, а также альбумин, трансферрин и миоглобин [454].

Важную роль при повреждении ДНК играет тирозинкиназа c-Abl (от англ. «Abelson murine leukemia viral oncogene homolog»), передающая сигнал о повреждении ДНК цисплатином в цитоплазму [455]. Цисплатин способен расщеплять c-Abl, что способствует индукции апоптоза [456]. В отсутствии c-Abl цисплатин не способен активировать p38 и JNK [457].

Взаимодействия цисплатина с различными мишенями внутри клетки имеют сложный характер, он способен запускать разнообразные клеточные реакции (рисунок 5) [212]. При этом результат взаимодействия будет зависеть от типа клеток, длительности воздействия препаратом, количества задействованных путей и др. [458].



Рисунок 5. Клеточный ответ на повреждение ДНК цисплатином, адаптировано из [212]

#### Влияние цисплатина на сигналы МАРК

Воздействие цисплатином влияет на митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК). В клетках млекопитающих до недавнего времени выделяли 3 сигнальных МАРК каскада: каскад экстраклеточной сигнал-регулирующей киназы (ERK, от англ. «extracellular signal-related kinase»), JNK и p38 [212], однако к настоящему моменту некоторые исследователи начали выделять 4 каскада: ERK1/2, ERK5, p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) и JNK 1/2/3 [459]. Таким образом, ERK paзделен на 2: ERK5 и ERK1/2. Данные сигнальные механизмы имеют ряд сходств: аминоконцевая область ERK5 содержит киназный домен, аналогичный домену ERK1/2 и имеет последовательность активации TEY, однако карбоксиконцевая область ERK5 является уникальной. ERK5 играет ключевую роль в развитии сердечно-сосудистой системы и дифференцировке нервной системы [459].

# <u>Сигнальный каскад ERK</u>

Существует предположение, что развитие устойчивости к цисплатину в клетках HeLa обусловлено снижением ответа ERK на лечение [212, 216]. Показано. ERK что активация необходима ЛЛЯ развития цисплатининдуцированного апоптоза в двух вариантах HeLa клеток, а также в клетках легкого человека А549, при этом подавление ERK приводит к ингибированию индуцированного апоптоза, а его активация – к усиленной гибели клеток [460]. Также цисплатин способен индуцировать экспрессию генов белков контроля клеточного цикла и репарации ДНК (p21WAF1, Gadd45) и белков-регуляторов p53 (Mdm2), но не влияет на экспрессию Bax, Bcl-2, Bcl-x1 или циклина G в клеточной линии карциномы яичника А2780. Вместе с этим, ингибирование цисплатин-индуцированной активности ERK приводило к снижению уровней p21WAF1, Gadd45 и Mdm2 [212, 461]. Некоторые исследования показывают, что белки ERK способствуют выживанию при лечении цисплатином меланомы [462], рака яичников [463, 464], рака шейки матки SiHA [465], рака желудка [466].

Таким образом, можно заключить, что изменение активности ERK при воздействии цисплатином имеет разнообразные последствия для

жизнеспособности опухолей и зависит от их типа, времени, длительности и интенсивности воздействия [212].

# <u>Сигнальный каскад JNK</u>

Роль JNK в действии цисплатина на клеточные культуры также неоднозначна [212]. Существуют исследования, выявившие активацию данного пути при гибели клеток, вызванной цисплатином [467, 468], но есть и работы, указывающие на возможную защитную роль JNK в цисплатин-индуцированной гибели [469, 470]. Клетки, дефектные по JNK, обладают повышенной устойчивостью к действию цисплатина [471]. Длительность активации JNK имеет решающее значение, определяющее дальнейшую судьбу клетки: её выживание или гибель через апоптоз [467, 468].

# Сигнальный каскад р38

Подобно JNK, кратковременная активация p38 МАРК в ранние сроки после воздействия цисплатином наблюдается в устойчивых к действию цисплатина клетках, в чувствительных же к действию цисплатина клетках наблюдается длительная активация p38 МАРК [472]. Ингибирование p38 МАРК способствует устойчивости клеток к действию цисплатина [467, 473]. Обработка куркумином устойчивых к действию цисплатина клеток рака яичников приводит к активации p38 МАРК одновременно с ингибированием фосфорилирования Akt, что в конечном итоге приводит к образованию 'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, остановке клеточного цикла в G (2)/M, апоптозу [474]. Также активация данного каскада наблюдалась в различных экспериментальных моделях, что способствовало формированию чувствительного к действию цисплатина фенотипу [475].

Таким образом, все сигнальные каскады МАРК вместе или по отдельности участвуют в ответе клеток на цисплатин [212]. Так, например, в работе [460] показано, что в ответ на обработку клеток цисплатином происходит активация как JNK, так и p38, однако, ингибирование данных сигнальных механизмов не влияло на чувствительность культуры, главная роль в выживании клеток при лечении цисплатином, вероятно, зависела от ERK. По-видимому, реакция клеток через сигнальные МАРК каскады будет в большой степени зависеть от длительности и силы воздействия цисплатином, а также от самого типа клеточной линии.

# Влияние цисплатина на Akt

Сигнальный путь PI3K-Akt (или Akt) способствует выживанию и росту клеток в ответ на внеклеточные стимулы. Основными действующими белками в данном сигнальном механизме являются фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K, от англ. «phosphatidylinositol 3-kinase») и протеинкиназа В (PKB, от англ. «Protein kinase B», или Akt) [476]. Существуют работы, показывающие, что устойчивость к действию цисплатина связана с активацией PI3K-Akt. Так показано, что Xсвязанный ингибитор апоптоза (XIAP, от англ. «X-linked inhibitor of apoptosis») способен ингибировать цисплатин-индуцированную гибель раковых клеток яичника A2780 посредством фосфорилирования и активации Akt [212, 477]. Ингибирование PI3K/Akt повышает чувствительность раковых клеток яичника к цисплатину in vitro, а также усиливает противоопухолевую активность цисплатина у мышей nude с ксенотрансплантатом рака яичника человека Caov-3 [478]. Существует предположение, что Akt может приводить к стимуляции хеморезистентности за счет снижения фосфорилирования р53 и активации р53зависимого модулятора апоптоза (PUMA, от англ. «p53 upregulated modulator of apoptosis») [479]. С участием Akt связано приобретение устойчивости к цисплатину клетками мелкоклеточного рака легкого [213], яичников [478] и матки [480].

# Цисплатин и каспазный каскад

Цисплатин способен индуцировать апоптоз как через митохондриальный, так и через экстраклеточный механизм инициации [223, 481]. Цисплатин может вызывать индукцию каспазного каскада через активацию каспазы-8 в сигнальном комплексе DISC (рецептор Fas), вызывая в дальнейшем активацию каспазы-3 [482]. В то же время, существуют сведения о том, что индуцированный цисплатином апоптоз может протекать по механизму, независимому от каспазы-3, например, в опухолевых клетках яичника A2780 [483]. Также цисплатин может вызывать митохондриальное высвобождение цитохрома С и активацию каспазы-3 [484]. В клетках остеосаркомы человека цисплатин индуцирует апоптоз посредством последовательной активации каспазы-8, каспазы-3 и каспазы-6 [485]. Цитотоксичность цисплатина может быть связана с ядерной транслокацией фактора AIF, экспрессией проапоптотического белка Вах, расщеплением каспаз 3 и 9 и расщеплением PARP [223].

# 1.4.2 Цисплатин и пероксид водорода

Помимо повреждения ДНК, цисплатин способен вызывать образование АФК в нормальных [486-488], а также в опухолевых клетках [489, 490]. Количество АФК зависит от продолжительности воздействия и концентрации цисплатина. Генерируемые цисплатином АФК повреждают множество клеточных структур, включая митохондрии, что приводит к активации нескольких сигнальных путей и в конечном итоге к клеточной гибели [217, 491]. Показано, что предварительная обработка клеток NAC эффективно блокировала цисплатин-индуцированную активацию ERK и предотвращала развитие апоптоза, при этом АФК, вероятно, приводили к активации рецепторов фактора роста и последующих звеньев сигнальных механизмов с участием Ras, Raf, MEK и ERK [460]. Ингибирование Ras коррелирует с устойчивостью к воздействию цисплатина, а сверхэкспрессия Ras повышает чувствительность к его воздействию [492, 493]. Защитная функция NAC путем непосредственного удаления АФК и посредством активации ERK 1/2 не зависит от его способности усиливать синтез глутатиона [494]. Цисплатин способствует увеличению уровня TNF-а, снижению количества СОД и GSP, митохондрий, оказывает нейротоксичное лействие вакуолизации на периферические нервы крыс, а введение NAC уменьшает данные эффекты [495]. Это указывает на роль АФК в вызываемых цисплатином эффектах. Также следует учитывать, что тиольные группы могут связываться и инактивировать

платиновые комплексы [496]. Тем не менее, роль отдельных АФК, в том числе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, в цисплатин-индуцированном апоптозе до конца не ясна.

Существует несколько работ, указывающих на участие  $H_2O_2$  в развитии апоптоза и некоторых побочных эффектах, вызываемых цисплатином. Показано, что изменение уровня креатинина в сыворотке пациентов, которым проводилось лечение цисплатином, коррелирует с увеличением количества  $H_2O_2$ , также это в значительной степени связано с изменениями всех почечных параметров, которые были оценены после инфузии цисплатина [497].

В работе Wang L. с соавторами показано, что при обработке клеток цисплатином в дозе, вызывающей подавление Bcl-2 и последующее развитие апоптоза, происходит образование множества различных AФK, однако обработка каталазой и глутатионпероксидазой уменьшали вызываемые цисплатином эффекты, указывая, что  $H_2O_2$  являлся основным окислительным компонентом, ответственным за подавление Bcl-2 цисплатином [498]. В эксперименте также наблюдалось увеличение количества ' $O_2^-$ , его ингибирование с помощью COД не предотвращало подавление Bcl-2, вызванное цисплатином.

Ингибирование  $H_2O_2$  каталазой приводит к снижению гибели клеток и увеличению экспрессии Bcl-2 в активированных Т-клетках [499]. Обработка клеток рака эпителия легких человека цисплатином индуцирует быструю генерацию АФК, приводящую к увеличению числа апоптотичских клеток, при этом смерть опосредуется через митохондрии и требует активации каспазы-9 и зависящим от экспрессии Bcl-2 [500]. Ингибирование АФК антиоксидантным ферментом каталазой или глутатионпероксидазой предотвратило вызванное цисплатином подавление Bcl-2, в то время как при ингибировании АФК супероксиддисмутазой и формиатом натрия подобного эффекта не наблюдалось, что свидетельствовало о существенном влиянии  $H_2O_2$  на Bcl-2 и апоптотическую гибель клеток [500].  $H_2O_2$  способен вызывать активацию ERK2, а также увеличивать экспрессию мPHK MAPK-зависимых генов с-jun, c-fos и MAPK-фосфатазы-1 [501], что может являться причиной вызываемого цисплатином апоптоза [502].

# ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 2.1 Оборудование и материалы

# Оборудование и культуральная посуда

СО<sub>2</sub>-инкубатор МС0175 (Sanyo, Япония); ламинарно-потоковый шкаф I класса биологической безопасности (Kojair Tech Oy, Финляндия); ламинарнопотоковый шкаф II класса биологической безопасности (NuAire, CША); весы аналитические Adventurer Pro (Ohaus Instruments (Shanghai) Co., Ltd., Китай); одноканальные механические дозаторы Transferpette S переменного объема (Brand GMBH + CO KG, Германия); высокоскоростная центрифуга с охлаждением Z36 НК (Hermle Labor Technik, Германия); центрифуга-вортекс Microspin FV-2400 (Biosan, Латвия); камера Горяева (МиниМед); деионизатор воды Simplicity (Merck Millipore, Франция); магнитная мешалка MSH-300 (Biosan, Латвия); фильтрующие насадки и мембраны с размером пор 0,45 мкм (Millipore); инвертированный Axiovert 200 (Carl Zeiss, флуоресцентный микроскоп Германия); лазерный планшетный спектрофотометр Synergy Mx (BioTek, США); цитофлуориметр проточный FACSCalibur (Becton Dickinson, CША); проточный цитофлуориметр-сортер FACSAria III (Becton Dickinson, США); стерилизатор (ОАО "Тюменский завод медицинского оборудования и паровой ВК-75 инструментов"); холодильники специальные и бытовые, поддерживающие температуру +4 и -135°С.

Адгезивные культуральные флаконы и планшеты (Corning, Великобритания); наконечники для автоматических пипеток (Greiner); центрифужные пробирки Falcon на 15 и 50 мл (BD Biosciences); центрифужные микропробирки на 0,5, 1,5 и 2 мл (Eppendorf, Германия); пробирки для проточного цитофлуориметра (BD Biosciences, CША); стеклянные шпатели; одноразовые шприцы стерильные.

#### Реактивы

Реактивы отечественного производства (категории «осч»): ≪ХЧ≫ И питательная среда DMEM (ПанЭко, Россия), L-глутамин (ПанЭко, Россия), 0.1% трипсина (ПанЭко, Россия), ЭДТА 0.01% (ПанЭко, Россия), фосфатносолевой буфер в таблетках, PBS (ПанЭко, Россия), диметилсульфоксид (ДМСО; ПанЭко, Россия), трипановый синий (ПанЭко, Россия), цисплатин (Тева, Израиль), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ; ПанЭко, Россия), трипановый синий (ПанЭко, Россия).

Зарубежные реактивы: эмбриональная сыворотка теленка (HyClone, США); N-ацетил, l-цистеин (Sigma-Aldrich, США), N, N'-диметилтиомочевина, (Sigma-Aldrich, США).

Флуоресцентные красители: MitoStatus TMRE (Becton Dickinson Pharmingen, США), 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (Sigma-Aldrich, США).

Наборы: Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I (Becton Dickinson Pharmingen, США).

#### 2.2 Методы

# 2.2.1 Культивирование опухолевых культур

В работе были использованы клетки карциномы шейки матки HeLa Kyoto, трансфицированные сенсорами HyPer2 или SypHer2 (предоставлены Институтом биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова), а также не подвергшиеся данной трансфекции.

Монослойное культивирование осуществлялось в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в среде Игла, модифицированной Дульбекком, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка и 2 мМ L-глутамина. Высаживание в планшеты осуществлялось за сутки до начала экспериментов.

# 2.2.2 Определение жизнеспособности клеточных линий

## Метилтетразолиевый тест

Цитотоксичность цисплатина в отношении опухолевых клеток определяли при помощи метилтетразолиевого теста (МТТ-тест). МТТ-тест основан на способности НАДФ-Н-зависимых оксиредуктазных дегидрогеназ жизнеспособных клеток конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) в кристаллы формазана [328, 329].

Клетки HeLa Kyoto, HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2 высевали в 96-луночный планшет в количестве 3×10<sup>3</sup> клеток на 1 лунку. После культивирования исходную среду заменяли свежей средой, содержащей цисплатин в концентрациях от 0 до 50 мкМ. Инкубацию с препаратом проводили в течение 24 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37,0°C, 5% CO<sub>2</sub>), затем клетки промывали раствором PBS и в каждую лунку заливали по 200 мкл среды, содержащей 0,5 мг/мл МТТ. Клетки снова помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 4 часа, после чего среду с МТТ отбирали. Образовавшийся формазан лизировали добавленным по 100 мкл на лунку раствором ДМСО в течение 40 мин при постоянном помешивании. Оптическую плотность полученного раствора формазана в ДМСО измеряли на планшетном спектрофотометре Synergy MX (BioTek, США) при длине волны 570 нм. Всего было проведено 8 экспериментов в трехкратной повторности для HeLa Kyoto-HyPer2, 7 экспериментов в трехкратной повторности для HeLa Kyoto-SypHer2 и 4 эксперимента в трехкратной повторности для HeLa Kyoto. Данные МТТ-теста каждой из исследуемых культур представляли в виде среднего значения ± СОС. Расчет IC<sub>50</sub> (концентрация препарата, вызывающая 50% снижение относительной жизнеспособности культуры) проводили в программе GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, США) методом нелинейной регрессии, была использована четырехпараметрическая «доза-эффект». модель Интенсивность окраски в лунках с необработанными цисплатином клетками была принята за 100% жизнеспособность.

#### Окрашивание трипановым синим

Также проводилась цитотоксичности оценка цисплатина методом Трипановый синий представляет окрашивания трипановым синим. собой анионный краситель, способный проникать сквозь поврежденные мембраны и связываться с внутриклеточными белками [503], окрашивая клетки в голубой цвет. Живые клетки с неповрежденной мембраной при данном методе анализа остаются неокрашенными. Таким образом, можно подсчитать количество живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) клеток в культуре, однако, данный метод не позволяет отделить некротические клетки от апоптотических [504].

Клетки HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2 высеивали за сутки до эксперимента в количестве  $1 \times 10^5$  клеток на 1 лунку в 12-луночный планшет, затем среду меняли на свежую, содержащую цисплатин в концентрации 8,3 мкМ -IC<sub>50</sub>. Экспозиция с препаратом составляла от 0 до 24 часов, подсчет окрашенных клеток производился каждые 2 часа. Затем клетки снимали раствором трипсина 0,1% и ЭДТА 0,01% в соотношении 1:1. Клетки промывали раствором PBS и окрашивали 0,2% раствором трипанового синего в течение 1-2 минут. Подсчет окрашенных и неокрашенных клеток выполняли под микроскопом в камере Горяева. Всего было проведено по 3 эксперимента для каждой клеточной линии в двукратной повторности. Данные эксперимента представляли в виде среднего значения  $\pm$  COC.

# 2.2.3 Изучение динамики уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на разных стадиях клеточной гибели

Для разработки методики, позволяющей цитометрически определить уровень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на разных стадиях клеточной гибели, были использованы возрастающие концентрации цисплатина при различных длительностях инкубации. Для каждой концентрации препарата во всех временных точках был проведен анализ жизнеспособности клеточных линий, а также были проанализированы изменения

в уровнях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и pH отдельно для популяций жизнеспособных, апоптотических, а также мертвых клеток.

Анализ распределения клеток по стадиям клеточной гибели осуществлялся по степени накопления ФС на внешней поверхности плазматической мембраны. Клетки HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2 высевали в 12-луночный планшет в количестве 1×10<sup>5</sup> клеток на 1 лунку и культивировали в течение 24 часов, затем ростовую среду в лунках заменяли на свежую, содержащую разные концентрации цисплатина: 4,2 мкМ (1/2×IC<sub>50</sub>), 8,3 мкМ (IC<sub>50</sub>), 16,6 мкМ (2×IC<sub>50</sub>), 33,2 мкМ (4×IC<sub>50</sub>), 83,0 мкМ (10×IC<sub>50</sub>), 200 мкМ (сверхвысокая доза), в качестве контроля использовались клетки, в которых среда менялась на свежую, не содержащую цисплатин. Инкубацию с препаратом проводили в течении 6, 12 и 24 часов, клетки снимали с подложки охлажденным раствором PBS, промывали дважды, и окрашивали набором на апоптоз PE Annexin V apoptosis detection kit I в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ цитоплазматических уровней H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и pH осуществлялся при помощи генетически-кодируемых сенсоров HyPer2 и SypHer2. Возбуждение флуоресценции вызывалось аргоновым лазером с длиной волны 488 нм, регистрация флуоресценции красителей и сенсоров проводилась при помощи проточного цитофлуориметра FACSCalibur и набора фильтров: 530/30 нм – флуоресценция HyPer2 и SypHer2, канал FL1; 585/42 нм – флуоресценция ФЭ Аннексина V, канал FL2; 670 нм (LP) – флуоресценция 7-AAD, канал FL3.

Дополнительно исследовали воздействие цисплатином в концентрациях 0; 4,2 мкМ; 8,3 мкМ; 16,6 мкМ; 33,2 мкМ; 83,0 мкМ при 18-часовой инкубации, окрашивание проводилось по описанной выше схеме. Возбуждение и регистрация флуоресценции осуществлялись при помощи проточного цитофлуориметра FACSAria III. Флуоресценции сенсоров возбуждалась на длине волны 488 нм, красителей – на 561 нм. Регистрация флуоресценции сенсоров осуществлялась при помощи фильтра 530/30 нм, канал FL1, ФЭ Аннексина V – с использованием фильтра 580/15 нм, канал FL2, для регистрации флуоресценции 7-AAD использовался фильтр 710/50 нм, канал FL3. Всего при длительности инкубации 6 часов было проведено 4 эксперимента для HeLa Kyoto-HyPer2 и 5 экспериментов для HeLa Kyoto-SypHer2, при инкубации 12 часов – по 5 экспериментов для каждой клеточной линии, при инкубации 18 часов – по 3 эксперимента, при экспозиции с препаратом в течение 24 часов - 6 экспериментов для HeLa Kyoto-HyPer2 и 5 экспериментов для HeLa Кyoto-SypHer2. Графики представлены в виде средних значений ± CO.

# 2.2.4 Изучение динамики уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в условиях использования ловушек АФК

# Экстернализация фосфатидилсерина

Анализ распределения клеток по стадиям клеточной гибели осуществлялся по описанной выше методике, решающее значение при этом имела степень экстернализации ФС. Для подтверждения роли H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> были использованы ловушки АФК: N-ацетил-L-цистеин и N,N'-диметилтиомочевина.

Клетки HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2 высевали в 12-луночный планшет в количестве 1×10<sup>5</sup> клеток на 1 лунку и культивировали в течение 24 часов. Затем ростовую среду в лунках заменяли на свежую, содержащую 5,0 мМ NAC либо 15,0 мкМ ДМТМ, а также - в половине проб - 16,6 мкМ цисплатина (2×IC<sub>50</sub>). В качестве контроля использовались клетки, в которых среда менялась на свежую, не содержащую цисплатина и ловушек АФК. Инкубацию с препаратом проводили в течение 24 часов. Клетки снимали с подложки охлажденным раствором PBS, промывали дважды и окрашивали набором на апоптоз PE Annexin V apoptosis detection kit I (BD Biosciences, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Определение цитоплазматических уровней H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и рН осуществлялось при помощи сенсоров HyPer2 SypHer2. Анализ генетически-кодируемых И образцов цитофлуориметре проводился проточном FACSCalibur. Возбуждение на флуоресценции вызывалось аргоновым лазером с длиной волны 488 нм, регистрация флуоресценции красителей и сенсоров проводилась при помощи

набора фильтров: 530/30 нм – флуоресценция HyPer2 и SypHer2, канал FL1; 585/42 нм – флуоресценция ФЭ Аннексина V, канал FL2; 670 LP – флуоресценция 7-AAD, канал FL3.

При инкубации клеток в течение 18 часов в качестве ловушки АФК был использован NAC в концентрации 5,0 мМ. Возбуждение и регистрация флуоресценции осуществлялись при помощи проточного цитофлуориметрасортера FACSAria III. Флуоресценция сенсоров возбуждалась на длине волны 488 нм, красителей – на 561 нм. Регистрация флуоресценции сенсоров осуществлялась при помощи фильтра 530/30 нм, канал FL1, ФЭ Аннексина V – с использованием фильтра 580/15 нм, канал FL2, для регистрации флуоресценции 7-AAD использовался фильтр 710/50 нм, канал FL3.

Всего при длительности инкубации 18 часов было проведено 3 эксперимента на клетках HeLa Kyoto-HyPer2 и 4 – на клетках HeLa Kyoto-SypHer2. При длительности инкубации 24 часа было проведено по 4 эксперимента с добавлением NAC для обеих клеточных линий, с ДМТМ – 4 эксперимента на клетках HeLa Kyoto-HyPer2 и 3 эксперимента на клетках HeLa Kyoto-SypHer2. Графики представлены в виде средних значений ± CO.

# Определение состояния мембранного потенциала митохондрий

Для разделения клеток на популяции живых, апоптотических и мертвых также использовался метод определения состояния мембранного потенциала митохондрий, который снижается на ранней стадии апоптоза. Поскольку потеря  $\Delta \Psi m$  может быть временным явлением, окрашивание TMRE нельзя использовать в экспериментах с участием ингибиторов каспаз [505].

Клетки HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2 высевали в 12-луночный планшет в количестве  $1 \times 10^5$  клеток на 1 лунку и культивировали в течении 24 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37,0°C, 5% CO<sub>2</sub>), ростовую среду в лунках заменяли на свежую, содержащую/не содержащую 16,6 мкМ цисплатина ( $2 \times IC_{50}$ ) и 5,0 мМ NAC. В качестве контроля использовались клетки, в которых среда менялась на свежую, не содержащую цисплатин и NAC среду. После 18 часов инкубации

клетки снимали с подложки охлажденным раствором PBS, промывали и окрашивали 25 нМ ТМRE в течение 30 минут при 37°C в темноте. После этого клетки окрашивались 7-AAD при комнатной температуре без доступа света в течение 15 минут. Анализ образцов проводили методом проточной цитометрии с использованием цитофлуориметра-сортера FACSAria III. Для возбуждения сенсоров использовали лазер на длине волны 488 нм, для возбуждения TMRE и 7-AAD - 561 нм. Регистрация флуоресценции осуществлялась при помощи фильтров: 530/30 нм для сенсоров, 588/15 нм для TMRE и 710/50 нм для 7-AAD. Эксперименты проводились в 6 повторностях независимо для обеих клеточных линий. Графики представлены в виде средних значений ± CO.

# 2.2 Статистический анализ данных

Сравнение кривых жизнеспособностей по результатам МТТ-теста проводилось по критерию Фишера при помощи программы GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, США).

Оценка статистической значимости различий в количестве живых/мертвых клеток при сравнении с исходным количеством клеток по результатам окрашивания трипановым синим была проведена методом t-test (критерий Стьюдента для независимых выборок) с использованием программы Statistica10 (StatSoft Inc, США).

Оценка статистической значимости различий в количестве живых, апоптотических и мертвых клеток при воздействии возрастающих концентраций цисплатина в сравнении с исходным количеством подобных клеток в контроле, а также сравнение флуоресценции сенсоров при воздействии возрастающих концентраций цисплатина в сравнении с исходным уровнем флуоресценции серсоров (в отсутствии воздейсттвия препаратов) тоже была проведена методом ttest (критерий Стьюдента для независимых выборок) с использованием программы Statistica10 (StatSoft Inc,CША).

Сравнение уровня флуоресценции сенсоров в апоптотических и живых клетках при действии цисплатина производилось методом t-test (критерий Стьюдента для независимых выборок) с использованием программы Statistica10 (StatSoft Inc,CША).

Для оценки статистической значимости различий в количестве живых, апоптотических и мертвых клеток при воздействии цисплатина и/или ловушек АФК, а также для оценки статистической значимости различий в уровне флуоресценции сенсоров при воздействии цисплатина и/или ловушек АФК между группами использовался однофакторный дисперсионный post-hoc анализ с критерием Бонферрони с использованием программы Statistica10 (StatSoft Inc,США).

# ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

# 3.1 Определение жизнеспособности клеточных линий

# Определение жизнеспособности по активности НАДФ-Н–зависимых клеточных оксидоредуктазных ферментов

По данным МТТ-теста были построены кривые зависимости жизнеспособности клеточный линий HeLa Kyoto, HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2 от концентрации цисплатина (рисунок 6).



Рисунок 6. Жизнеспособность опухолевых культур HeLa Kyoto, HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2 при воздействии 0–50 мкМ цисплатина. Время инкубации: 24 часа

Поскольку выживаемость клеточных культур не может быть выше 100% и ниже 0%, при построении кривых были заданы параметры верхнего и нижнего плато: приближение к 100 и к 0 соответственно. Анализ коэффициента Хилла (коэффициент наклона кривой) для всех клеточных линий оказался ниже стандартного (<-1). a кривых относительно короткое, колено что свидетельствовало о высокой чувствительности к действию препарата (таблица 1). Сравнение кривых жизнеспособности показало, что клеточные линии с генетически кодируемыми сенсорами HyPer2 и SypHer2 отвечают на повышение концентрации препарата практически идентично, концентрации ингибирования 50% (IC<sub>50</sub>) их клеток сходны: 8,30 мкМ [7,30; 9,45] и 8,54 мкМ [7,40; 9,81] соответственно. Необходимо отметить, что, несмотря на схожую динамику ответа, чувствительность клеточной линии, не содержащей генетическикодируемых сенсоров, была ниже, IC<sub>50</sub> цисплатина для неё составил 10,53 мкМ [8,40; 13,19]. Значение IC<sub>50</sub> для HeLa Kyoto сопоставимо с представленным в статье [506] – 12,6 мкМ [9,7; 15,5].

Таблица 1

		95%		95% доверительный
Клеточная	IC <sub>50</sub>	доверительны	коэффициент	интервал
линия	мкМ	й интервал	Хилла	коэффициента
		IC <sub>50</sub> , мкМ		Хилла
HeLa Kyoto-	8,30	[7,3; 9,45]	-2,196	[-2,739; -1,652]
HyPer2				
HeLa Kyoto-	8,54	[7,4; 9,81]	-2,108	[-2,651; -1,566]
SypHer2				
HeLa Kyoto	10,53	[8,4; 13,19]	-1,876	[-2,583; -1,170]

Сравнение кривых жизнеспособности клеточных линий

Для анализа сходства ответов трех клеточных линий был применен критерий Фишера. В качестве нулевой гипотезы было использовано предположение о возможности описания всех полученных данных одной кривой, в качестве альтернативной гипотезы – предположение, что каждой из трех выборок (каждой из трех клеточных линий) соответствует своя кривая. При уровне значимости меньше 0,05 нулевая гипотеза была бы опровергнута, в противном случае – принята. При сравнении всех кривых одновременно и при попарном сравнении критерий Фишера был выше 0,05 (таблица 2), что позволило в дальнейших исследованиях использовать одни и те же концентрации препаратов для работы с тремя клеточными линиями. Для расчета рабочих концентраций цисплатина была использована IC<sub>50</sub>, определенная для HeLa Kyoto-HyPer2.

Таблица 2.

Клеточная линия	HeLa Kyoto-	HeLa Kyoto-	HeLa Kyoto	Bce
	HyPer2	SypHer2		клеточные
				линии
HeLa Kyoto-				
HyPer2		p = 0,92	p = 0,11	
HeLa Kyoto-				
SypHer2	p = 0,92		p = 0,19	
HeLa Kyoto	n = 0.11	p = 0.19		
		P 0,17		
Все клеточные				0.10
линии				p = 0,18

Сопоставление кривых жизнеспособности по Критерию Фишера

МТТ-тест широко применяется в качестве простого способа оценки выживания, роста, дифференцировки, окислительного стресса и гибели клеток при различных воздействиях [328, 507-509]. Большинством исследователей считается, что восстановление МТТ осуществляется за счет работы ферментов митохондрий и переносчиков электронов [510-512]. В тоже время, есть работы, указывающие на возможность участия немитохондиальных ферментов в его восстановлении, например, в восстановлении МТТ могут участвовать ЭПР, плазматические мембраны, цитозоль [513-516].

Уменьшение количества МТТ в клетках может рассматриваться как «окислительно-восстановительной активности [517]. показатель клеток» Полученная в нашей работе небольшая разница в чувствительности клеточных линий может быть связана с наличием флуоресцентного белка, воздействующего через некоторые механизмы на гомеостаз клетки. Показано, что, внедрение в клетку GFP увеличивает её чувствительность к фотодинамической терапии, приводя к повышению производства <sup>1</sup>О<sub>2</sub> и индукции окислительного стресса [518-520]. Внедрение таких флуоресцентных белков, как TagRFP, KillerRed, miniSOG и их производных в клетку также способствует образованию окислителей, главным образом синглетного кислорода и супероксида в ответ на облучение [520, 521]. Трансфекция клеток нейробластомы GFP приводит к индукции окислительного стресса, это вызывает увеличение чувствительности клеток к действию таких препаратов, как карбоплатин, доксорубицин, этопозид и мелфалан в сравнении с клетками, которые не подвергались подобной трансфекции [522].

#### Определение жизнеспособности по целостности плазматической мембраны

Окрашивание трипановым синим используется для быстрой оценки целостности плазматической мембраны клеточных линий [523].

Для оценки результатов окрашивания трипановым синим были построены гистограммы соотношения живых и мертвых клеток для обеих клеточных линий с воздействием или без воздействия (контроль) цисплатином в концентрации 8,3 мкМ (IC<sub>50</sub>) в течение 24 часов, измерения проводились с интервалом в 2 часа (рисунок 7).



Рисунок 7. Количество жизнеспособных и мертвых клеток, определенных методом окрашивания трипановым синим при воздействии 8,3 мкМ цисплатина. HeLa Kyoto-HyPer2, (Б) HeLa Kyoto-SypHer2. Оценка статистической **(A)** жизнеспособных/мертвых значимости различий В количестве клеток при \* p < 0,05, \*\* < 0,001, сравнении с исходным количеством клеток: р \*\*\* p < 0,0001
При воздействии цисплатином в концентрации 8,3 мкМ количество живых клеток для обеих клеточных линий колебалось в незначительных пределах в течение всего времени исследования, через 24 часа количество живых клеток было соизмеримо с таковым в начальный момент воздействия - 0 часов. В отличие от этого, количество живых клеток, как в клеточной линии HeLa Kyoto-HyPer2, так и в клеточной линии HeLa Kyoto-SypHer2 в отсутствии воздействия препаратом (контроль) увеличивалось с течением времени и через 24 часа возрастало примерно в 2,2 раза в сравнении с начальным значением при 0 часов инкубации. Процент живых клеток остается выше 90% для всех проб, кроме 24-х часового воздействия цисплатином в пробе с HeLa Kyoto-HyPer2, в которой среднее значение в это время составило  $87\% \pm 7\%$ .

Количество мертвых клеток с увеличением длительности инкубации в сравнении с пробой в начальный момент времени для обеих клеточных линий увеличивалось как в варианте с цисплатином, так и без цисплатина. Количество мертвых клеток HeLa Kyoto-HyPer2 в контроле увеличилось в 2,0 раза, в пробах с цисплатином в 4,3 раза к 24 часам инкубации. Количество мертвых клеток HeLa Kyoto-SypHer2 увечилось в контроле в 3,8 раза, в пробах с цисплатином – в 1,6 раза к 24 часам инкубации. Однако при рассмотрении доли мертвых клеток, очевидно, что изменения со временем в контрольных пробах незначительны: увеличилось на 4% для HeLa Kyoto-HyPer2, для HeLa Kyoto-SypHer2 произошло увеличение на 1% (с 2% до 3%). В пробах с добавлением цисплатина увеличение процентного содержании мертвых клеток для HeLa Kyoto-SypHer2 оставалось низким: 3% (с 4% до 7%), и только для клеточной линии HeLa Kyoto-HyPer2 при добавлении препарата изменения в проценте мертвых клеток являются более существенными к 24 часам воздействия: на 10% (с 3% до 13%). Эти данные свидетельствуют о том, что воздействие цисплатином в концентрации, равной IC<sub>50</sub>, приводит в бо́льшей степени к остановке клеточного деления, чем к клеточной гибели. Следовательно, низкие концентрации цисплатина в большей степени вызывают цитостатический эффект, в то время как высокие концентрации препарата преимущественно обладают цитотоксическим действием [509].

Полученные результаты хорошо согласуются с литературными источниками. Способность цисплатина и других платиновых комплексов останавливать клеточный цикл была показана многими авторами [441, 443-445]. Однако, у разных клеточных линий цисплатин вызывает остановку в разных фазах клеточного цикла [441, 444-446] Для каждого типа клеток эффективная доза препарата будет различной, а выбор клеткой точки ареста и длительность остановки клеточного цикла зависят от дозы цисплатина [445, 446], что, вероятно, могло бы объяснить разницу в полученных результатах в разных работах. Также показано, что остановка в G2 фазе может играть роль в дальнейшем при запуске цисплатин-индуцированной гибели [446]. Наши данные показали, что цисплатин в концентрации IC<sub>50</sub> практически не приводит клетки HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2 к гибели в течение 24-х часов воздействия, следовательно, данная концентрация препарата недостаточна для изучения механизма апоптотической гибели клеток в течение первых суток после введения препарата в среду.

# 3.2 Разработка методики изучения уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> одновременно с механизмом клеточной гибели

Разработана методика, основанная на использовании генетическикодируемых сенсоров одновременно с витальным красителем и маркерами на апоптоз и позволяющая методом проточной цитофлуориметрии определить уровень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> отдельно в популяциях живых и апоптотических клеток, а также осуществить контроль pH в каждой из клеточных популяций [405].

Окрашивание клеток производилось в двух сочетаниях, в обоих случаях использовался витальный краситель 7-ААD. 7-ААD способен проникать в клетку через поврежденную мембрану и связываться с участками ДНК, содержащими гуанин и цитозин [524]. Флуоресцентные свойства позволяют применять его в таких методах, как флуоресцентная микроскопия и проточная цитометрия [525-527]. В первом варианте окрашивания 7-ААD применялся в сочетании с ФЭ Аннексином V, имеющим сродство к ФС, во втором варианте – одновременно с ТМRE, указывающим на изменение  $\Delta \Psi$ m. Для определения изменений в уровнях  $H_2O_2$  и pH использовались флуоресцентные сенсоры: HyPer2, чувствительный к изменениям содержания и  $H_2O_2$ , и pH [400] и SypHer2, обладающий чувствительностью только к изменениям pH [528].

#### Экстернализация фосфатидилсерина

Экстернализация ФС происходит во время деградационной стадии апоптоза, предшествуя сжатию цитоплазмы, уменьшению размеров клетки и блеббингу [110]. Использование двух красителей, ФЭ Аннексина V и 7-AAD, позволило распеделить все клетки на 3 популяции по степени окрашивания: 1) живые клетки – клетки, не окрашенные ни одним из красителей, 2) клетки, проходящие стадии апоптоза – окрашенные Аннексином V, но не окрашенные 7-AAD, 3) мертвые клетки – клетки, которые окрашивались обоими красителями или окрашивались 7-AAD, но не окрашивались Аннексином V (рисунок 8). После распределения

клеток на популяции живых, апоптотических и мертвых по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, осуществлялся анализ флуоресценции сенсоров HyPer2 или SypHer2 в популяциях живых и апоптотических клеток по отдельности.



Интенсивность флуоресценции сенсора, отн. ед.

Рисунок 8. Методика оценки уровня Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> и/или рН В живых И апоптотических клетках, а также во всех клетках, основанная на интенсивности окрашивания ФЭ Аннексина V и 7-ААD.

М1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения

Поскольку в мертвых клетках флуоресценция сенсоров была сильно снижена в связи с их вероятной утечкой через повреждённую плазматическую мембрану при подготовке клеток к проточной цитометрии, либо по причине повреждения

сенсоров в мертвых клетках при данном способе пробоподготовки, либо по другой причине, уровень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а также pH в данных клетках не мог быть проанализирован.

Таким образом, флуоресценция сенсоров учитывалась для всех клеток, а также отдельно для популяций живых и апоптотических клеток. Анализ отклика сенсоров осуществлялся при помощи расчета медианного значения пика распределения клеток по интенсивности флуоресценции.

## Изменение мембранного потенциала митохондрий

Помимо экстернализации фосфатидилсерина на поверхность плазматической мембраны, в качестве показателя апоптозного процесса часто используется изменение ΔΨm [98, 107]. Простым способом определения изменений ΔΨm является использование красного флуоресцентного красителя TMRE [98]. В отличие от Аннексина V, данный краситель окрашивает клетки, сохранившие жизнеспособность, и в сочетании с 7-AAD он также позволяет выделить 3 популяции клеток: 1) живые клетки – интенсивно окрашенные TMRE, но не окрашенные 7-AAD, 2) клетки, находящиеся в стадии апоптоза - не окрашенные ни одним из красителей, 3) мертвые клетки – клетки, которые окрашивались обоими красителями или окрашивались 7-AAD, но не окрашивались TMRE (рисунок 9).

Для проверки участия  $H_2O_2$  в наблюдаемых реакциях дополнительно в обе методики были включены инкубации опухолевых культур с ловушками АФК (NAC или ДМТМ) [407, 408]. Также было проведено исследование изменений общего количества АФК, для чего в методике определения апоптозного процесса по изменению мембранного потенциала была произведена замена клеточной культуры на не содержащую генетически кодируемых сенсоров, при этом клетки подвергались окрашиванию DCFH-DA. Распределение клеток на жизнеспособные, апоптотические и мертвые клетки было схоже с показанным на рисунке 9.



Интенсивность флуоресценции сенсора, отн. ед.

Рисунок 9. Методика оценки уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и/или pH в живых и апоптотических клетках, а также во всех клетках, основанная на интенсивности окрашивания TMRE и 7-AAD.

M1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения

Анализ отклика сенсоров также осуществлялся при помощи расчета медианного значения пика распределения клеток по интенсивности флуоресценции в живых и апоптотических клетках по отдельности.

Методика предусматривает возможность *in vitro* изучения изменений уровня  $H_2O_2$  в клетках в ответ на различные типы противоопухолевых воздействий [405, 409] возможность определения различных стадий апоптоза, сопровождающих эти

изменения в одинаковых условиях [407, 408], а также возможность исследования уровня других форм АФК с использованием специфичных красителей [529]. В настоящей работе методика была использована для изучения динамики уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на разных стадиях цисплатин-индуцированной клеточной гибели и верификации его роли в развитии апоптоза.

# 3.3 Изучение динамики уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на разных стадиях клеточной гибели

# Определение стадий клеточной гибели

Для апробации методики, позволяющей определить уровень  $H_2O_2$  на разных стадиях клеточной гибели, были использованы возрастающие концентрации цисплатина при различных длительностях инкубации. Для каждой концентрации препарата во всех временных точках был проведен анализ жизнеспособности клеточных линий.

При инкубации с цисплатином в течение 6 часов характер клеточного ответа был схож у обеих клеточных линий (рисунок 10, 11). Как клетки HeLa Kyoto-HyPer2, так и клетки HeLa Kyoto-SypHer2 практически не подвергались клеточной гибели, сохраняя жизнеспособность выше 60% даже при максимальной исследуемой концентрации препарата 200 мкМ (рисунок 12). При этом не было выявлено статистически значимых различий в проценте жизнеспособных, апоптотических и мертвых клеток между обработанными цисплатином и контрольными клетками для обеих клеточных линий.



Интенсивность флуоресценции ФЭ Аннексина V, отн. ед.

Рисунок 10. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-HyPer2 на популяции живых (Ж), апоптотических (А), мертвых (М) клеток относительно степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-ААД при воздействии возрастающих концентраций цисплатина. Длительность инкубации с цисплатином 6 часов



Интенсивность флуоресценции ФЭ Аннексина V, отн. ед.

Рисунок 11. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-SypHer2 на популяции живых (Ж), апоптотических (А), мертвых (М) клеток относительно степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-ААД при воздействии возрастающих концентраций цисплатина. Длительность инкубации с цисплатином 6 часов



Рисунок 12. Процент жизнеспособных, апоптотических и мертвых клеток при воздействии возрастающих концентраций цисплатина: (A) HeLa Kyoto-HyPer2 (Б) HeLa Kyoto-SypHer2. Длительность инкубации с цисплатином 6 часов

При увеличении длительности инкубации до 12 часов у обеих клеточных линий наблюдалось статистически значимое снижение процента жизнеспособных клеток по отношению к контролю при инкубации с высокими концентрациями препарата – 83,0 и 200,0 мкМ. Увеличение процента апоптотических клеток наблюдалось лишь при концентрации цисплатина 83,0 мкМ у обеих клеточных линий:  $32 \pm 14\%$  - HeLa Kyoto-HyPer2,  $37 \pm 15\%$ , значительное увеличение процента мертвых клеток у обеих клеточных линий было выявлено лишь при инкубации с 200,0 мкМ цисплатина (рисунок 12, 13, 14).



Интенсивность флуоресценции ФЭ Аннексина V, отн. ед.

Рисунок 13. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-HyPer2 на популяции живых (Ж), апоптотических (А), мертвых (М) клеток относительно степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-ААД при воздействии возрастающих концентраций цисплатина. Длительность инкубации с цисплатином 12 часов



Интенсивность флуоресценции ФЭ Аннексина V, отн. ед.

Рисунок 14. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-SypHer2 на популяции живых (Ж), апоптотических (А) и мертвых (М) клеток относительно степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-ААД при воздействии возрастающих концентраций цисплатина. Длительность инкубации с цисплатином 12 часов



Рисунок 15. Процент жизнеспособных, апоптотических и мертвых клеток при воздействии возрастающих концентраций цисплатина: (A) HeLa Kyoto-HyPer2 (Б) HeLa Kyoto-SypHer2. Длительность инкубации с цисплатином 12 часов. Оценка статистической значимости различий в количестве живых, апоптотических и мертвых клеток при сравнении с исходным количеством клеток: \* p < 0.05, \*\* p < 0.0001

Через 18 часов инкубации статистически значимое снижение количества жизнеспособных клеток наблюдалось уже при инкубации с 8,3 мкМ цисплатина у SypHer2, клеточной линии, содержащей a также при более высоких концентрациях препарата для обеих клеточных линий. Процент апоптотических клеток был максимальным при воздействии препаратом в концентрации 16,6 мкМ:  $33 \pm 9\%$  – для HeLa Kyoto-HyPer2,  $24 \pm 2\%$  – для HeLa Kyoto-SypHer2. Процент мертвых клеток был статистически значимо увеличен по сравнению с контролем при добавлении любой концентрации цисплатина в экспериментах с использованием клеток линии HeLa Kyoto-SypHer2, при этом статистически достоверное отличие процента мертвых клеток HeLa Kyoto-HyPer2 от контроля наблюдалось лишь при концентрациях цисплатина 33,2 мкМ и 83,0 мкМ (рисунок 16, 17, 18.).



Интенсивность флуоресценции ФЭ Аннексина V, отн. ед.

Рисунок 16. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-HyPer2 на популяции живых (Ж), апоптотических (А) и мертвых (М) по степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-ААД при воздействии возрастающих концентраций цисплатина. Длительность инкубации с цисплатином 18 часов



Интенсивность флуоресценции ФЭ Аннексина V, отн. ед.

Рисунок 17. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-SypHer2 на популяции живых (Ж), апоптотических (А) и мертвых (М) по степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-ААД при воздействии возрастающих концентраций цисплатина. Длительность инкубации с цисплатином 18 часов



Рисунок 18. Процент жизнеспособных, апоптотических и мертвых клеток при воздействии возрастающих концентраций цисплатина: (A) HeLa Kyoto-HyPer2 (Б) HeLa Kyoto-SypHer2. Длительность инкубации с цисплатином 18 часов. Оценка статистической значимости различий в количестве живых, апоптотических и мертвых клеток при сравнении с исходным количеством клеток: \* p < 0.05, \*\* p < 0.001, \*\*\* p < 0.001

При инкубации с цисплатином в течение 24 часов статистически значимое снижение доли жизнеспособных клеток сочеталось со статистически значимым увеличением процента мертвых клеток и наблюдалось уже при низких концентрациях препарата: 8,3 мкМ для HeLa Kyoto-HyPer2 и 4,2 мкМ для HeLa Kyoto-SypHer2. Эта реакция усиливалась с увеличением концентрации цисплатина, приводя к практически полной гибели клеток при 200,0 мкМ цисплатина: HeLa Kyoto-HyPer2 – 93 ± 9% и HeLa Kyoto-SypHer2 – 96 ± 2%. Статистически значимое увеличение процента апоптотических клеток HeLa Kyoto-SypHer2 было выявлено при воздействии цисплатина в концентрациях 8,3 мкм и выше 33,2 мкМ (рисунок 19, 20, 21).

Результаты данного окрашивания несколько отличаются от данных окрашивания трипановым синим. При 24-часовой инкубации с 8,3 мкМ цисплатина при окрашивании трипановым синим процент клеток с поврежденной

мембраной составлял около 13% у HeLa Kyoto-HyPer2 и около 7% у HeLa Kyoto-SypHer2 (рисунок 7), в то время как окрашивание с использованием 7-AAD (набор PE Annexin V apoptosis detection kit I), показало, что около 29% клеток HeLa Kyoto-HyPer2 и 25% клеток HeLa Kyoto-SypHer2 имели повреждения плазматической мембраны (рисунок 21).

Это связано с особенностями действия самих красителей. Считается, что оба красителя «выбрасываются» живой клеткой, однако возможность окрашивания живой клетки красителем зависит от таких свойств, как его гидрофобность, молекулярный вес, ионная сила растворителя, а также pH [530], поэтому проникающие способности красителей будут отличаться при сходных условиях.



Интенсивность флуоресценции ФЭ Аннексина V, отн. ед.

Рисунок 19. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-HyPer2 на популяции живых (Ж), апоптотических (А) и мертвых (М) по степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-ААД при возрастающих концентраций цисплатина. Длительность инкубации с цисплатином 24 часа

Попадая во внутреннее пространство клетки, трипановый синий связывается с различными белками, несущими положительный заряд [503], в то время как 7-ААD при проникновении в клетку может связываться с ДНК на участках, содержащих гуанин и цитозин [117, 531]. Также 7-ААD характеризуется высокой константой связывания и низкой скоростью диссоциации [532].



Интенсивность флуоресценции ФЭ Аннексина V, отн. ед.

Рисунок 20. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-SypHer2 на популяции живых (Ж), апоптотических (А) и мертвых (М) по степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-ААД при воздействии возрастающих концентраций цисплатина. Длительность инкубации с цисплатином 24 часа

Следует учитывать особенности данных методик при анализе полученных данных: при использовании проточной цитометрии клетки многократно промываются и осаждаются центрифугированием, что могло дополнительно привести к повреждению плазматической мембраны анализируемых клеток, в то время, как окрашивание трипановым синим происходит в более «щадящем» режиме.



Рисунок 21. Процент жизнеспособных, апоптотических и мертвых клеток при воздействии возрастающих концентраций цисплатина: (A) HeLa Kyoto-HyPer2 (Б) HeLa Kyoto-SypHer2. Длительность инкубации с цисплатином 24 часа. Оценка статистической значимости различий в количестве живых, апоптотических и мертвых клеток при сравнении с исходным количеством клеток: \* p < 0.05, \*\* p < 0.001, \*\*\* p < 0.001

Окрашивание клеток ФЭ Аннексином V и 7-AAD позволило выявить две концентрации препарата, способных вызывать наибольший процент апоптотических клеток как в культуре HeLa Kyoto-HyPer2, так и в культуре HeLa Kyoto-SypHer2, соответственно. При этом процент апоптотических клеток при 12часовом воздействии 83,0 мкМ цисплатина был несколько выше ( $32 \pm 14\%$  - HeLa Kyoto-HyPer2,  $37 \pm 15\%$  – HeLa Kyoto-SypHer2), чем при 18 часах воздействия 16,6 мкМ цисплатина ( $33 \pm 9\%$  – HeLa Kyoto-HyPer2,  $24 \pm 2\%$  – HeLa Kyoto-SypHer2). Следует обратить внимание, что концентрация 83,0 мкМ соответствует 10×IC<sub>50</sub> цисплатина в изучаемых клеточных линиях и является довольно высокой концентрацией для воздействия на клеточные культуры, в то время как 16,6 мкМ соответствует 2×IC<sub>50</sub> цисплатина.

Необходимо отметить, что при всех длительностях воздействия цисплатином (кроме 6 часов инкубации) клетки исследуемых линий в подавляющем большинстве сначала окрашивались Аннексином V, что свидетельствовало об экстернализации фосфатидилсерина и, следовательно, о внутриклеточных изменениях, характерных для апоптоза, и лишь затем подвергались окрашиванию 7-ААД. Практически все клетки (как HeLa Kyoto-HyPer2, так и HeLa Kyoto-SypHer2) при достаточном времени и/или концентрации препарата подвергались ПКГ, проходящей по апоптотическому типу. Скорость протекающей ПКГ и процент клеток, переходящих из популяции живых клеток в популяцию затем И мертвых клеток апоптотических, a при всех рассмотренных длительностях инкубации был схож у обеих исследуемых линий. Таким образом, окрашивание клеток ФЭ Аннексином V и 7-AAD показало, что распределение по стадиям клеточной гибели у обеих клеточных линий происходит схожим образом и имеет выраженный дозо- и время-зависимый характер. Следовательно, Kyoto-SypHer2, клеточную линию HeLa позволяющую определить изменения рН, было использовать внутриклеточные можно В качестве контрольной по отношению к клеточной линии HeLa Kyoto-HyPer2, указывающей как на внутриклеточные изменения рН, так и на цитоплазматические изменения уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Это позволило в дальнейшем выявить причину в изменениях флуоресценции сенсора HyPer2.

Был проведен анализ влияния цисплатина на цитоплазматические уровни H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и pH в исследуемых клеточных линиях.

### Влияние цисплатина на цитоплазматический уровень $H_2O_2$ и рН

Были проанализированы изменения в уровнях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и pH отдельно для популяций жизнеспособных, апоптотических, а также мертвых клеток. При этом

интенсивность флуоресценции контрольных клеток (клеток без воздействия цисплатином) была принята за 100%.

Через 6 часов инкубации с цисплатином в различных концентрациях статистически значимое в сравнении с контролем изменение флуоресценции HyPer2 было зарегистрировано лишь в сверхвысокой концентрации - 200,0 мкМ как в живых, так и в апоптотических клетках:  $158 \pm 40\%$  и  $169 \pm 28\%$  соответственно (рисунок 22). В тех же условиях инкубации с препаратом измерения флуоресценции клеток, содержащих нечувствительный к изменениям уровня пероксида водорода сенсор – SypHer2, показали, что данные условия не способны приводить к существенным изменениям во внутриклеточном уровне pH (рисунок 23). Таким образом, наблюдаемые изменения в интенсивности флуоресценции HyPer2 обусловлены повышением уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при инкубации в течении 6 часов с экстремально высокой концентрацией препарата - 200,0 мкМ.

Распределение клеток по интенсивности флуоресценции сенсоров показало, что как в популяции живых, так и в популяции апоптотических клеток содержатся клетки с низким содержанием сенсора, что могло быть связано с его потерей или повреждением во время пробоподготовки, либо с мутацией клеток и последующей потерей сенсора во время их культивирования (рисунок 22, 23). Флуоресценция клеток с низким содержанием сенсора была подобна таковой в мертвых клетках.



Рисунок 22. Изменение флуоресценции сенсора HyPer2 при воздействии возрастающих концентраций цисплатина в течение 6 часов: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, рис. 10), (Б) пример распределения по интенсивности флуоресценции всех клеток, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза.

M1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения. Оценка статистической значимости различий в количестве живых и апоптотических клеток с их количеством в контроле (без воздействия цисплатином): \* p < 0,05



Рисунок 23. Изменение флуоресценции сенсора SypHer2 при воздействии возрастающих концентраций цисплатина в течение 6 часов: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, рис. 11), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза.

M1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения

Увеличение длительности инкубации с цисплатином до 12 часов приводило к росту интенсивности флуоресценции HyPer2 в живых клетках при концентрациях препарата 83,0 мкМ -  $230 \pm 52\%$  и 200,0 мкМ -  $202 \pm 36\%$ , однако в апоптотических клетках лишь доза в 83,0 мкМ вызывала существенное увеличение интенсивности флуоресценции сенсора:  $234 \pm 70\%$  (рисунок 24).

Статистически значимое снижение интенсивности флуоресценции сенсора SypHer2 после инкубации в течение 12 часов наблюдалось при 83,0 мкМ и 200,0 мкМ цисплатина:  $67 \pm 19\%$  и  $67 \pm 20\%$  (рисунок 25), что свидетельствовало о закислении внутриклеточной среды.



Рисунок 24. Изменение флуоресценции сенсора HyPer2 при воздействии возрастающих концентраций цисплатина в течение 12 часов: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, рис. 13), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза.

M1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения. Оценка статистической значимости различий в количестве живых и апоптотических клеток с их количеством в контроле (без воздействия цисплатином): \* p < 0,05



Рисунок 25. Изменение флуоресценции сенсора SypHer2 при воздействии возрастающих концентраций цисплатина в течение 12 часов: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, рис. 14), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках.

M1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения. Оценка статистической значимости различий в количестве живых и апоптотических клеток с их количеством в контроле (без воздействия цисплатином): \* p < 0,05

Такое изменение pH в клетках могло влиять на изменение интенсивности флуоресценции сенсора HyPer2, снижая ее в клетках, содержащих данный сенсор. Следовательно, наблюдаемое увеличение интенсивности флуоресценции HyPer2 при 83,0 и 200,0 мкМ цисплатина и длительности воздействия в 12 часов было бы

более выраженным при неизменном pH. Это свидетельствовало о том, что количество  $H_2O_2$  в клетках возрастало существеннее, чем могло бы показаться при анализе реакции только HyPer2 (рисунок 24).

Увеличение длительности воздействия цисплатина еще на 6 часов приводило к росту интенсивности флуоресценции HyPer2 при более низких концентрациях цисплатина. Так, через 18 часов инкубации в живых клетках интенсивность флуоресценции HyPer2 возрастала до 170 ± 32% при 16,6 мкМ цисплатина, до  $240 \pm 82\%$  при 33,2 мкМ и до  $216 \pm 27\%$  при 83,0 мкМ цисплатина. Изменение интенсивности флуоресценции сенсора в апоптотических клетках было более выраженным и начиналось уже при 8,3 мкМ препарата, что соответствовало IC<sub>50</sub>. При этом для клеток, проходящих стадию апоптоза, значения превышают таковые для живых клеток. Увеличение интенсивности флуоресценции сенсора HyPer2 в данных клетках составило:  $150 \pm 2\%$  при 8,3 мкM,  $249 \pm 66\%$  при 16,6 мкM, 384 ± 104% при 33,2 мкМ и 311 ± 71% при 83,0 мкМ цисплатина (рисунок 26). Интенсивность флуоресценции сенсора SypHer2 показала, что через 18 часов инкубации с различными концентрациями цисплатина значительных изменений в уровне pH не происходит (рисунок 27). Следовательно, реакция сенсора HyPer2 при данной длительности воздействия препаратом была обусловлена только увеличением внутриклеточного уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Рисунок 26. Изменение флуоресценции сенсора HyPer2 при воздействии возрастающих концентраций цисплатина в течение 18 часов: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, рис. 16), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза.

M1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения. Оценка статистической значимости различий в количестве живых и апоптотических клеток с их количеством в контроле (без воздействия цисплатином): \* p < 0,05, \*\* p < 0,001, \*\*\* p < 0,001



Рисунок 27. Изменение флуоресценции сенсора SypHer2 при воздействии возрастающих концентраций цисплатина в течение 18 часов: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, рис. 3.2-9), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза.

M1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения.

При инкубации с цисплатином в течение 24 часов количество живых клеток при высоких концентрациях препарата было недостаточным для анализа изменений реакции сенсоров в них (рисунок 28, 29). Интенсивность флуоресценции HyPer2 увеличивалась при воздействии 16,6 мкМ и 33,2 мкМ цисплатина как в живых, так и в апоптотических клетках и составляла: 146 ± 27%

и  $256 \pm 37\%$  при 16,6 мкМ и  $196 \pm 41\%$  и  $293 \pm 60\%$  соответственно (рисунок 28). Интенсивность флуоресценции SypHer2 была увеличена в сравнении с контролем в апоптотических клетках при инкубации с низкими концентрациями препарата: 148 ± 21% при 4,2 мкМ и 137 ± 10% при 8,3 мкМ цисплатина. что свидетельствовало о защелачивании внутриклеточной среды. Однако В концентрациях 16,6 мкМ и 33,2 мкМ, при которых наблюдались изменения флуоресценции сенсора HyPer2, статистически значимых изменений в интенсивности флуоресценции SypHer2 в сравнении с контролем не наблюдалось (рисунок 29). Следовательно, повышение интенсивности флуоресценции сенсора HyPer2 после 24 часов инкубации с 16,6 мкМ и 33,2 мкМ цисплатина было обусловлено увеличением концентрации Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в опухолевых клетках. Также следует отметить, что, учитывая изменения интенсивности флуоресценции сенсора SypHer2, при действии 4,2 мкМ и 8,3 мкМ цисплатина количество H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> могло быть определено как сниженное в сравнении с контрольными интактными клетками.



Рисунок 28. Изменение флуоресценции сенсора HyPer2 при воздействии возрастающих концентраций цисплатина в течение 24 часов: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, рис. 19), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза.

M1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения. Оценка статистической значимости различий в количестве живых и апоптотических клеток с их количеством в контроле (без воздействия цисплатином): \* p < 0,05, \*\* p < 0,001, \*\*\* p < 0,001



Рисунок 29. Изменение флуоресценции сенсора SypHer2 при воздействии возрастающих концентраций цисплатина в течение 24 часов:

(А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, рис.
20), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза.

М – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения. Оценка статистической значимости различий в количестве живых и апоптотических клеток с их количеством в контроле (без воздействия цисплатином): \* p < 0,05

В наших экспериментах показано, что даже высокие дозы препарата (200 мкМ) при инкубации в течение 6 часов не были способны привести к клеточной гибели. Однако увеличение длительности инкубации клеток HeLa Kyoto с

препаратом до 12 часов и выше способствовало прохождению клетками стадии экстернализации фосфатидилсерина, что свидетельствовало о происходящем апоптотическом процессе. Максимальное количество апоптотических клеток наблюдалось при 83,0 мкМ цисплатина при 12 часах воздействия (рисунок 15), а также 16,6 мкМ цисплатина при 18 часах воздействия (рисунок 18). В обоих случаях наблюдалось значительное увеличение количества H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в сравнении с необработанными цисплатином клетками (рисунок 24, 26). Полученные данные согласуются с исследованиями других авторов, показывающих, что цисплатин способен вызывать повышенное образование АФК и окислительный стресс [219, 488, 533]. Показано, что в клетках млекопитающих митохондриальная продукция АФК усиливает цитотоксический эффект цисплатина, вызванный повреждением ядерной ДНК [219]. Цисплатин провоцировал окислительное повреждение митохондриальных липидов и окисление митохондриальных белков клеток почек у самцов крыс линии Wistar, при этом повышенная активность каспазы-3 свидетельствовала об активации в них апоптоза [488]. Обработка слуховых клеток мыши HEI-OC1 цисплатином увеличивала экспрессию NLRX1 одновременно с увеличением продукции АФК и развитием апоптоза [533].

Кроме того, существуют работы, указывающие, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может являться участником клеточной реакции на воздействие противоопухолевыми агентами, включая цисплатин, а также способствовать развитию апоптоза [16, 18, 253, 500]. Так, экспозиция клеток лейкемии (HL-60 и CEM) и колоректальной карциномы (HCT116) с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может являться сигналом для транслокации белков семейства Вах, как и его внутриклеточная продукция при апоптозе, индуцированном лекарственными препаратами [18]. Окислительное повреждение ДНК клеток лейкемии HL-60, вызванное генерацией H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при воздействии доксорубицина может служить критическим триггером апоптоза, однако апоптоз, вызванный доксорубицином. включать ингибирование теломеразы может также II. Увеличение ΔΨm активация каспазы-3 при подобном воздействии И предшествовали образованию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [16]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> изменяет экспрессию генов, связанных с передачей сигналов и метаболизмом клеток кардиомиоцитов кур, а

также изменяет экспрессию генов, непосредственно связанных с апоптозом, например,  $H_2O_2$  влияет на биосинтез и процессинг белков и ненасыщенных жирных кислот [253]. При воздействии цисплатина на клетки рака эпителия легких человека происходит быстрое образование АФК, индуцирующее активацию митохондриального механизма нициации апоптоза посредством активации каспазы-9 и экспрессии Bcl-2, существенное влияние на Bcl-2 при этом, вероятно, оказывает  $H_2O_2$  [500].

B нашем исследовании практически все клетки, погибающие при воздействии цисплатина, претерпевали экстернализацию фосфатидилсерина, что исключало некротический механизм гибели. Однако существуют работы, указывающие на возможную роль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в передаче сигналов при некрозе [255, 256]. Индуцированный цисплатином апоптоз в культуре клеток проксимального канальца почек кролика был связан с активацией митохондриального механизма инициации апоптоза, выходом цитохрома С и активацией каспазы 3. Поскольку апоптоз ингибировался добавлением диметилтиомочевины и тирона, но не добавлением каталазы, было предположено, что OH, а не H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> являлся участником апоптотической реакции. В то же время, вызванный большими концентрациями цисплатина некроз предотвращался каталазой и пируватом, которые снижают концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, что предполагало его участие в некротической реакции [256]. Обработка кардиомиоцитов крыс H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывала матриксной некротическую гибель. повышение уровня/активности металлопротеиназы-2, при этом максимальный эффект наблюдался при 200 мкМ [255]. Считается, что выбор клеткой апоптотического или некротического механизма гибели определяется концентрацией и длительностью воздействия цисплатина. При больших концентрациях и коротких временах воздействия клетка склонна погибать путем некроза в то время как более длительное воздействие низкими концентрациями препарата вызывает преимущественно активацию апоптоза [256, 534]. Таким образом, можно предположить, что выявленный в нашем исследовании рост уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> был недостаточным для развития некротической реакции.

Добавление цисплатина вызывало изменения внутриклеточного уровня pH, способствуя закислению внутриклеточной среды в живых клетках в высоких концентрациях препарата при инкубации в течение 12 часов – 83,0 мкМ и 200 мкМ (рисунок 25), и ее защелачиванию у апоптотических клеток при воздействии низких концентраций препарата – 4,2 мкМ и 8,3 мкМ – в течение 24 часов (рисунок 29).

Ранее нами также было показано, что непосредственное добавление цисплатина в концентрации IC<sub>50</sub> к исследуемым культурам не приводит к существенным сдвигам ни в уровне цитоплазматического H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ни в уровне внутриклеточного рН в течение 20 минут [535]. В [528] показано, что добавление цисплатина в концентрации 2,4 – 2,6 мкМ (IC<sub>30</sub>) к клеточной культуре HeLa вызывает закисление среды вскоре после добавления препарата (через 45 минут). В дальнейшем в умирающих клетках рН менялся в значительных пределах в течение 5 часов, и в период с 6 до 24 часов такие клетки погибали. Клетки, способные поддерживать щелочной баланс при воздействии цисплатином в дозе 2,4 – 2,6 мкМ (IC<sub>30</sub>) до 4,5-5 часов, в дальнейшем выживали и были способны 24-48 поддерживать гомеостаз длительное часов время, a через ИХ внутриклеточная среда становилась более кислой в сравнении с исходным уровнем. Необходимо отметить, что такие различия в реакции клеток были выявлены при мониторинге индивидуальных клеток, усреднение значений рН не показывало каких-либо различий в динамике.

В нашем исследовании использовались гораздо более высокие концентрации цисплатина, а изменения в уровне рН оценивались раздельно для популяций живых или апоптотических клеток, что затрудняет сравнение полученных c описанной выше работой, В которой результатов не проводилось предварительное деление клеток на популяции. Однако можно отметить, что клетки, суммарный уровень рН которых при 12 часах инкубации с препаратом был сдвинут в более кислую сторону, также погибали к 24 часам инкубации с препаратом.
Таким образом, для последующих экспериментов была выбрана концентрация цисплатина 16,6 мкМ и длительность инкубации с препаратом 18 часов.

### 3.4 Изучение динамики уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в условиях использования ловушек АФК

#### 3.4.1 Определение апоптоза по экстернализация фосфатидилсерина

дополнительного подтверждения роли  $H_2O_2$ Для В цисплатининдуцированной гибели клеток были использованы ловушки АФК: NAC и ДМТМ [407, 408]. NAC является предшественником L-цистеина, участвующего в образовании глутатиона GSH, таким образом, его непрямое антиоксидантное действие в клетке определяется свойствами самого глутатиона. Также он способен восстанавливать HOCl и 'OH, несколько медленнее реагирует с  $H_2O_2$ [536]. ДМТМ обладает хорошей способностью к диффузии и является высокоэффективным поглотителем ОН<sup>•</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [537]. Таким образом, ни NAC, ни ДМТМ не являются специфичными ловушками на пероксид водорода, однако по результату их действия и реакции специфичного к изменениям уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> сенсора HyPer2 можно судить о роли  $H_2O_2$  в исследуемом процессе.

Добавление NAC в инкубационную среду предотвращало индуцированный цисплатином апоптоз через 18 часов инкубации с препаратом как в клеточной линии HeLa Kyoto-HyPer2 (рисунок 30; 32A), так и в клеточной линии HeLa Kyoto-SypHer2 (рисунок 31; 32Б). Реакции клеток обеих клеточных линий при данной длительности инкубации очень схожи: при одновременной инкубации цисплатина с NAC количество жизнеспособных клеток по сравнению с их количеством при инкубации только с цисплатином значительно возрастает, но не превышает 66%: у клеток HeLa Kyoto-HyPer2 с  $47 \pm 5\%$  до  $65 \pm 18\%$ , у HeLa

Куоto-SypHer2 с  $56 \pm 4\%$  до  $66 \pm 10\%$  (рисунок 32). Также введение NAC в инкубационную среду с цисплатином снижало количество апоптотических клеток у обеих клеточных линий: с  $33 \pm 9\%$  до  $17 \pm 8\%$  у HeLa Kyoto-HyPer2 и с  $24 \pm 2\%$  до  $17 \pm 8\%$  у HeLa Kyoto-SypHer2. Следует отметить, что добавление NAC увеличивало жизнеспособность обеих клеточных культур в сравнении с контролем даже в отсутствии воздействия цисплатином на 3-4%.



Рисунок 30. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-HyPer на популяции живых (Ж), апоптотических (А) и мертвых (М) по степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD при воздействии/без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC. Длительность инкубации 18 часов



Интенсивность флуоресценции ФЭ Аннексина V, отн. ед.

Рисунок 31. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-SypHer2 на популяции живых (Ж), апоптотических (А) и мертвых (М) по степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD при воздействии/без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC. Длительность инкубации 18 часов



Рисунок 32. Процент жизнеспособных, апоптотических и мертвых клеток, определенный по степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD при воздействии /без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC: (A) HeLa Kyoto-HyPer2, (**Б**) HeLa Kyoto-SypHer2. Длительность инкубации 18 часов. Оценка статистической значимости различий в количестве клеток в контроле (клетки без воздействия), при воздействии цисплатина и/или NAC: \* p < 0,05

Инкубация с цисплатином в течение 24 часов одновременно с NAC также способствовала выживанию обеих клеточных линий в сравнении с клетками, обработанными только цисплатином: на 38% у HeLa Kyoto-HyPer 2 (с  $20 \pm 15\%$  до  $58 \pm 19\%$ ) (рисунок 33, 35A) и на 31% у HeLa Kyoto-SypHer2 (с  $21 \pm 13\%$  до  $62 \pm 21\%$ ) (рисунок 34, 35Б). При этом вклад, вносимый изменением количества апоптотических клеток, был не столь существенным, как при длительности инкубации 18 часов, и не показал статистически достоверных различий между клетками, подвергшимися только воздействию цисплатина, и клетками, выдержанными в среде с добавлением и цисплатина, и NAC (рисунок 35).



Рисунок 33. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-HyPer2 на популяции живых (Ж), апоптотических (А) и мертвых (М) по степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD при воздействии /без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC. Длительность инкубации 24 часа



Рисунок 34. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-SypHer2 на популяции живых (Ж), апоптотических (А) и мертвых (М) по степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD при воздействии/без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC. Длительность инкубации 24 часа



Рисунок 35. Процент жизнеспособных, апоптотических и мертвых клеток, определенный по степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD при воздействии /без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC: (A) HeLa Kyoto-HyPer2, (Б) HeLa Kyoto-SypHer2. Длительность инкубации 24 часа. Оценка статистической значимости различий в количестве клеток в контроле (клетки без воздействия), при воздействии цисплатина и/или NAC:\* p < 0,005, \*\* p < 0,001

Внесение ДМТМ в качестве ловушки АФК в инкубационную среду, содержащую цисплатин, привело к схожим результатам, что и добавление NAC при длительности инкубации 24 часа, а именно, к увеличению количества жизнеспособных клеток: на 43% у HeLa Kyoto-HyPer2 (с  $29 \pm 12\%$  до  $72 \pm 12\%$ ) (рисунок 36; 38A) и на 31% у HeLa Kyoto-SypHer2 (с  $34 \pm 13\%$  до  $55 \pm 10\%$ ) (рисунок 37; 38Б). При этом следует обратить внимание, что внесение ДМТМ в среду с цисплатином привело к увеличению доли жизнеспособных клеток HeLa Kyoto-HyPer2 до уровня, соизмеримого с контролем –  $72 \pm 5\%$ , в то время как

жизнеспособность клеток HeLa Kyoto-SypHer2 возросла не столь значительно (жизнеспособность клеток HeLa Kyoto-SypHer2 без воздействия препарата – 78,4%) (рисунок 38).



Рисунок 36. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-HyPer на популяции живых (Ж), апоптотических (А) и мертвых (М) по степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD при воздействии /без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 15,0 мкМ ДМТМ. Длительность инкубации 24 часа



Рисунок 37. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-SypHer2 на популяции живых (Ж), апоптотических (А) и мертвых (М) по степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD при воздействии /без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 15,0 мкМ ДМТМ. Длительность инкубации 24 часа



Рисунок 38. Процент жизнеспособных, апоптотических и мертвых клеток, определенный по степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD при воздействии /без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 15,0 мкМ ДМТМ: (A) HeLa Kyoto-HyPer2, (**b**) HeLa Kyoto-SypHer2. Длительность инкубации 24 часа. Оценка статистической значимости различий в количестве клеток в контроле (клетки без воздействия), при воздействии цисплатина и/или ДМТМ: \* p < 0.05, \*\* p < 0.001, \*\*\* p < 0.001

Использование специфичного сенсора HyPer2 позволило отследить изменения уровня пероксида водорода при протекторном действии ловушек АФК в ходе их совместной инкубации с цисплатином. Наблюдалось значительное снижение интенсивности флуоресценции сенсора HyPer2 при одновременном добавлении NAC с цисплатином и инкубации в течение 18 часов как в популяции жизнеспособных, так и в популяции апоптотических клеток, претерпевающих экстернализацию фосфатидилсерина (рисунок 39): с  $170 \pm 32\%$  до  $132 \pm 10\%$  у жизнеспособных клеток и с  $263 \pm 47\%$  до  $158 \pm 22\%$  у апоптотических клеток.



Рисунок 39. Изменение флуоресценции сенсора HyPer2 при воздействии/без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, рис. 30, 32), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза. Длительность инкубации 18 часов.

M1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения. Оценка статистической значимости различий в количестве клеток в контроле (клетки без воздействия), при воздействии цисплатина и/или NAC: \* p < 0,05, \*\* p < 0,001, \*\*\* p < 0,0001

Добавление только NAC в культуральную среду практически не влияло на изменение интенсивности флуоресценции сенсора в обеих популяциях клеток: 106 ± 26% у жизнеспособных, 98 ± 27% у апоптотических.

При той же длительности воздействия сенсор SypHer2 не показал значительных изменений в интенсивности флуоресценции как при добавлении NAC и цисплатина по отдельности, так и при их одновременном добавлении в клеточную среду (рисунок 40).

Увеличение длительности инкубации до 24 часов не привело к значительным изменениям в интенсивности флуоресценции сенсора HyPer2 по сравнению с инкубацией 18 часов: одновременная инкубация с цисплатином и NAC вызывала ее снижение в сравнении с таковой при инкубации только с цисплатином – с  $155 \pm 13\%$  до  $112 \pm 13\%$  (рисунок 41). Однако инкубация клеток HeLa Kyoto-SypHer2 в течение этого времени одновременно с цисплатином и NAC привела к увеличению интенсивности флуоресценции SypHer2 популяции апоптотических клеток, в то время как инкубация с каждым из данных веществ по отдельности такого эффекта не вызывала (рисунок 42).



Рисунок 40. Изменение флуоресценции сенсора SypHer2 при воздействии/без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, рис. 31, 32), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза. Длительность инкубации 18 часов.

М1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения



Рисунок 41. Изменение флуоресценции сенсора HyPer2 при воздействии/без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, рис. 33, 35), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза. Длительность инкубации 24 часа.

М1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения. Оценка статистической значимости различий в количестве клеток в контроле (клетки без воздействия), при воздействии цисплатина и/или NAC: \* p < 0,05, \*\* p < 0,001</p>



Рисунок 42. Изменение флуоресценции сенсора SypHer2 при воздействии/без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, рис. 34, 35), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза. Длительность инкубации 24 часа.

М1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения. Оценка статистической значимости различий в количестве клеток в контроле (клетки без воздействия), при воздействии цисплатина и/или NAC: \* p < 0,05</p>

Замена NAC на другую ловушку  $A\Phi K - ДМТМ - в$  эксперименте с 24часовой инкубацией не выявила сильных изменений в отклике сенсора HyPer2. Добавление ДМТМ снижало вызванное цисплатином увеличение интенсивности флуоресценции, как в живых, так и в апоптотических клетках: с 177 ± 44% до 113 ± 14% у жизнеспособных клеток и с 287 ± 74% до 92 ± 19% (рисунок 43). При этом отдельная инкубация с ДМТМ не влияла на флуоресценцию сенсора [407].

Добавление ДМТМ вызвало увеличение интенсивности флуоресценции SypHer2 в живых клетках, как при инкубации с цисплатином, так и без него. Инкубация отдельно с цисплатином не влияла на интенсивность флуоресценции сенсора. Следовательно, изменения рН в живых клетках были вызваны не инкубацией с цисплатином, а добавлением ловушки АФК ДМТМ (рисунок 44).



Рисунок 43. Изменение флуоресценции сенсора HyPer2 при воздействии/без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 15,0 мкМ ДМТМ: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, рис. 36, 38), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза. Длительность инкубации 24 часа.

М1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения. Оценка статистической значимости различий в количестве клеток в контроле (клетки без воздействия), при воздействии цисплатина и/или NAC: \* p < 0,05</p>



Рисунок 44. Изменение флуоресценции сенсора SypHer2 при воздействии/без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 15,0 мкМ ДМТМ: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD, рис. 37, 38), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза. Длительность инкубации 24 часа.

M1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения. Оценка статистической значимости различий в количестве клеток в контроле (клетки без воздействия), при воздействии цисплатина и/или NAC:
\* p < 0,05, \*\* p < 0,001</li>

Полученные результаты окрашивания клеток обеих клеточных линий ФЭ Аннексином V и 7-AAD показали, что добавление ловушек АФК приводит к значительному увеличению их жизнеспособности, а также к существенному снижению процента апоптотических клеток при инкубации 18 часов (рисунок 32), но не при 24-часовой инкубации (рисунок 35, 38).

Следует отметить, что к 24 часам инкубации бо́льшая часть клеток уже прошла стадию экстернализации фосфатидилсерина и определялась как клетки, относящиеся к популяции мертвых, что могло помешать выявить влияние NAC и ДМТМ на процент апоптотических клеток.

Способность NAC предотвращать вызванный цисплатином апоптоз была продемонстрирована ранее. В работе [460] обнаружено, что добавленный с 30 мкМ цисплатина 1мМ NAC способен предотвратить развитие апоптоза клеток HeLa при инкубации в течение 24 часов посредством ингибирования ERK индуцированных цисплатином PARP. активации И расщепления Способность NAC повышать выживаемость клеток через активацию ERK предотвращать апоптоз была также показана другими авторами [538, 539]. NAC также способен ингибировать активацию с-Jun N-концевой киназы, p38 MAPкиназы, редокс-чувствительного активирующего белка-1, подавлять активность ядерного фактора транскрипции каппа В, а также предотвращать апоптоз и способствовать выживанию клеток путем активации внеклеточного сигналрегулирующего киназного пути [540].

NAC ингибирует цисплатин-индуцированную экспрессию p53 и p21 в клетках мелкоклеточной карциномы легких LX-1, NAC уменьшал токсичность цисплатина в SKOV3 как p53-зависимым, так и p53-независимыми механизмами [223]. Таким образом, NAC способен блокировать цисплатин-индуцированный апоптоз посредством ингибирования как митохондриального, так и рецепторозависимого механизмов.

ДМТМ также часто применяется в качестве ловушки АФК и способен снижать вызываемый различными стимулами, в том цисплатином, апоптоз [488, 541-544]. ДМТМ почти полностью защищал кардиомиоциты крыс от повреждения, вызванного гидропероксидом кумола, но не снижал высвобождение креатинкиназы из сердца, подвергшегося легкому или тяжелому повреждению, вызванному реоксигенацией [544]. Продемонстрировано, что введение ДМТМ одновременно с цисплатином и последующее двукратное его введение взрослым самцам крыс Wistar вызывало ряд положительных эффектов: снижало перекисное окисление липидов, окисление кардиолипина, сульфгидрильного белка, GSH, НАДФН, а также жесткость митохондриальной мембраны и уровень АТФ в способствуя апоптотических [488]. печени. уменьшению доли клеток Посредством ранней индукции цитоплазматических белков теплового шока -HSP60 (от англ. «Heat shock proteins») ДМТМ способен предотвратить Вахопосредованный апоптоз в клетках почечных канальцев, обеспечивая защиту цисплатин-индуцированной острой почечной недостаточности [543]. Способность уменьшать активацию р53 и ингибировать цисплатин-индуцированной апоптоз в культивируемых клетках проксимальных канальцев почек была показана как для ДМТМ, так и для NAC [542].

NAC считается эффективной ловушкой для  $A\Phi K$ , поскольку является предшественником L-цистеина, участвующего в синтезе глутатиона, а также способен непосредственно восстанавливать HOCl, 'OH и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [536, 545]. ДМТМ характеризуется хорошей способностью обезвреживать 'OH и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [537], также показано, что ДМТМ способствует ингибированию эндотелиального ангиогенеза микрососудов головного мозга крыс, спровоцированного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [546]. Наши результаты демонстрируют, что увеличение жизнеспособности клеточных линий при добавлении ловушек  $A\Phi K$  в инкубационную среду с цисплатином происходит одновременно со снижением флуоресценции чувствительного к изменениям уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cencopa HyPer2 (рисунок 39, 41, 43), что свидетельствует об участии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в индуцируемом цисплатином апоптозе.

## 3.4.2 Определение апоптоза по изменению мембранного потенциала митохондрий

Добавление NAC в инкубационную среду с цисплатином приводило к существенному увеличению процента жизнеспособных клеток у обеих клеточных линий в сравнении с клетками, обработанными только цисплатином: с  $28 \pm 6\%$  до  $71 \pm 18\%$  – у HeLa Kyoto-HyPer2, с  $24 \pm 5\%$  до  $61 \pm 9\%$  – у HeLa Kyoto-SypHer2 (рисунок 45-47). Одновременно с этим процент апоптотических клеток значительно снижался: с  $43 \pm 12\%$  до  $15 \pm 4\%$  – у HeLa Kyoto-HyPer2, с  $54 \pm 4\%$  до  $27 \pm 10\%$  – у HeLa Kyoto-SypHer2.



Интенсивность флуоресценции TMRE, отн. ед.

Рисунок 45. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-HyPer2 на популяции живых (Ж), апоптотических (А) и мертвых (М) по степени их окрашивания TMRE и 7-AAD при воздействии /без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC. Длительность инкубации 18 часов



Интенсивность флуоресценции TMRE, отн. ед.

Рисунок 46. Пример распределения клеток HeLa Kyoto-SypHer2 на популяции живых (Ж), апоптотических (А) и мертвых (М) по степени их окрашивания TMRE и 7-AAD при воздействии /без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC. Длительность инкубации 18 часов



Рисунок 47. Процент жизнеспособных, апоптотических и мертвых клеток, определенный по степени их окрашивания ТМRE и 7-ААD при воздействии /без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC. Длительность инкубации 18 часов. Оценка статистической значимости различий в количестве клеток в контроле (клетки без воздействия), при воздействии цисплатина и/или NAC: \* p < 0.05, \*\* p < 0.001, \*\*\* p < 0.001

Одновременное инкубирование клеток HeLa Kyoto-HyPer2 с цисплатином и NAC приводило к снижению интенсивности флуоресценции сенсора В апоптотических клетках в сравнении с клетками, подвергнутыми действию только цисплатина в течение 18 часов: с  $263 \pm 69\%$  до  $137 \pm 33\%$  (рисунок 48). Таким образом, устранение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с использованием NAC может быть причиной предотвращения падение мембранного потенциала митохондрий и развития апоптотической реакции при действии цисплатина. В то же время, флуоресценция сенсора SypHer2 при воздействии цисплатина и/или NAC не претерпевала какихлибо значительных изменений (рисунок 49).



Рисунок 48. Изменение флуоресценции сенсора HyPer2 при воздействии/без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания TMRE и 7-AAD, рис. 45, 47), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза. Длительность инкубации 18 часов.

М – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения. Оценка статистической значимости различий в количестве клеток в контроле (клетки без воздействия), при воздействии цисплатина и/или NAC: \* p < 0,001, \*\* p < 0,0001



Рисунок 49. Изменение флуоресценции сенсора SypHer2 при воздействии/без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC: (А) изменения медианных значений флуоресценции в живых и апоптотических клетках (разделение по степени окрашивания TMRE и 7-AAD, рис. 46, 47), (Б) пример флуоресценции во всех клетках, (В) пример флуоресценции в живых клетках, (Г) пример флуоресценции в клетках, находящихся в стадии апоптоза. Длительность инкубации 18 часов.

М – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения.

Влияние NAC на жизнеспособность клеточных линий было описано в предыдущих экспериментах с использованием в качестве маркера Аннексина V: NAC ингибировал апоптоз, вызванный цисплатином, значительно увеличивая процент жизнеспособных клеток. Однако распределение клеток на популяции

живых, апоптотических и мертвых по степени их окрашивания TMRE и 7-AAD показало, что увеличение интенсивности флуоресценции чувствительного к изменениям уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> сенсора наблюдалось исключительно у апоптотических, но не жизнеспособных клеток, подвергшихся инкубации только с цисплатином (рисунок 48). Следует отметить, что при развитии апоптоза изменение  $\Delta \Psi m$ , определяемое окрашиванием TMRE, происходит раньше, чем экстернализация ФС, определяемая Аннексином V. Поэтому при окрашивании TMRE клетки с нарушенным мембранным потенциалом, но еще не успевшие экстернализировать ФС, попадают в популяцию апоптотических. Эти же клетки при окрашивании на основе Аннексина V идентифицировались бы как относящиеся к популяции жизнеспособных клеток. Если же клетки успевали за время инкубации с препаратом и потерять  $\Delta \Psi m$ , и экстернализировать  $\Phi C$ , то они в обоих вариантах окрашивания были идентифицированы как апоптотические (рисунок 39; 48). Даже незначительное снижение  $\Delta \Psi m$  может привести к существенному увеличению производства АФК, способных нанести ущерб клетке [547]. В клетке, полвергшейся индуцированному TNF-α апоптозу, наблюдается частичное снижение  $\Delta \Psi m$ , сопровождаемое высоким уровнем активных форм кислорода [226]. Показано, что цисплатин вызывает окислительный стресс в митохондриях и снижает  $\Delta \Psi m$  [548]. В тоже время существуют данные, что каталаза предотвращает вызванную цисплатином потерю клетками  $\Delta \Psi m$ , свидетельствуя об участии пероксида водорода в данном процессе [549]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может являться основным окислительным компонентом, ответственным за подавление Bcl-2, возникающим одновременно с другими АФК при воздействии цисплатина [498].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе разработана новая методика оценки уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в популяциях жизнеспособных и апоптотических клеток независимо друг от друга. Возможность использования данной методики для оценки внутриклеточных контроле внутри изменений уровня  $H_2O_2$  при изменений pН клетки продемонстрирована примере противоопухолевого действия на препарата Цисплатин.

Проведено исследование влияния генетически-кодируемых сенсоров HyPer2 или SypHer2 на жизнеспособность клеточной линии HeLa Kyoto. Показано, что увеличение концентраций цисплатина вызывает схожее дозо- и время-зависимое влияние на жизнеспособность как в культуре с генетически кодируемыми сенсорами, так и в культуре без сенсоров.

Проведена оценка содержания Н2О2 в жизнеспособных и апоптотических HeLa Kyoto-SypHer2. C клетках HeLa Kyoto-HyPer2 И использованием флуоресцентных красителей, маркирующих процессы апоптоза на разных стадиях его развития, показано, что цисплатин-индуцированное накопление H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> происходит на фоне потери мембранного потенциала митохондрий и начинается экстернализации фосфатидилсерина. Продемонстрировано, раньше что добавление ловушек АФК способствует сохранению мембранного потенциала митохондрий и ингибирует экстернализацию фосфатидилсерина. Показано, что ловушки АФК при одновременном использовании с цисплатином предотвращают вызванную им клеточную гибель опухолевых клеток и сохраняют концентрацию  $H_2O_2$  на уровне, близком к контрольному.

#### выводы

- 1. Модификация клеток HeLa Kyoto сенсорами HyPer2 и SypHer2 не оказывает существенного влияния на их чувствительность к цисплатину.
- Низкие концентрации цисплатина в большей степени вызывают цитостатический эффект, высокие концентрации препарата обладают цитотоксическим действием.
- 3. Цисплатин вызывает дозо-зависимое увеличение уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках HeLa Куоtо. Наибольший подъем уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> выявлен при инкубации в течение 18 часов при концентрации 2×IC50 (16,6 мкМ). Динамика изменений уровня пероксида водорода различается в живых и апоптотических клетках, наиболее выраженный подъем выявлен у клеток, претерпевающих апоптоз.
- 4. Уровень пероксида клеточной гибели. водорода зависит ОТ стадии Сопоставление динамики уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> опухолевых клеток с маркерами разных стадий апоптоза показало, что рост его концентрации наблюдается потерей мембранного потенциала митохондриями одновременно С И выходу фосфатидилсерина предшествует на внешнюю поверхность плазматической мембраны.
- Добавление ловушек АФК ингибирует цисплатин-индуцированный апоптоз опухолевых клеток и препятствует повышению концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> как в живых клетках, так и в клетках, находящихся в апоптозе.

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АФК активные формы кислорода
- Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> пероксид водорода
- 7-ААD 7-аминоактиномицин D
- ФЭ Аннексин V фикоэритрин, коньюгированный с аннексином V
- ФЭ фикоэритрин
- TMRE от англ. «tetramethylrhodamine ethyl ester», этиловый эфир тетраметилродамина

NAC — N-ацетил-L-цистеин

- ДМТМ N, N'-диметилтиомочевина
- DCFH-DA от англ. «2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate», 2',7'дихлордигидрофлуоресцеин диацетат
- АТФ аденозинтрифосфат
- АДФ аденозиндифосфат
- ПКГ программируемая клеточная гибель
- MOMP от англ. «Mitochondrial outer membrane permeabilization», проницаемость наружной мембраны митохондрий
- ΔΨт митохондриальный трансмембранный потенциал
- ГП глутатионпероксидаза
- ЭПР эндоплазматический ретикулум
- Apaf-1 от англ. «Apoptosis protease activating factor-1» активирующий фактор-1 апоптотической протеазы
- mPTP от англ «Mitochondrial permeability transition pore», пора, изменяющая проницаемость мембраны митохондрии
- AIF от англ. «Apoptosis-inducing factor", апоптоз-индуцирующий фактор
- PARP от англ. «poly(adenosine ribose) polymerase», поли(АДФ-рибоза)полимераза

# TMRM – от англ. «etramethylrhodamine, methyl ester», метиловый эфир тертраметилродамина

ФС – фосфатидилсерин

- ФИТЦ от англ. «fluorescein isothiocyanate», FITC, изотиоцианат флуоресцеина
- ПИ пропидиум йодид
- TdT дезоксинуклеотидилтрансфераза
- •О2<sup>-</sup> супероксид анион-радикал
- НО 2 пероксидный радикал
- •ОН гидроксильный радикал
- $^{1}O_{2}$  синглетный кислород
- НО-2 пероксидный ион

HOC1 – гипохлорит

- $O_{3-030H}$
- $O_{2-}$ кислород

ЭТЦ – митохондриальная дыхательная цепь, электронно-транспортная цепь

- Н<sub>2</sub>О вода
- О2NOО- пероксинитрат
- СОД супероксиддисмутаза
- ИК ионизирующее излучение
- УФ ультрафиолетовое излучение
- мтДНК митохондриальная ДНК
- ПОЛ перекисное окисление липидов
- NOX (НАДФН-оксидаза) от англ. «Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase», оксидазы никотинамидадениндинуклеотидфосфата, NADPH-оксидаза
- TNF- $\alpha$  от англ. «tumor necrosis factor alpha», фактор некроза опухоли  $\alpha$
- JNK от англ . «c-Jun N-terminal kinase», c-Jun (от яп. «ju-nana») N-терминальная киназа
- ASK1 от англ. «Apoptosis signal-regulating kinase 1», киназа 1, регулирующая сигнал апоптоза

SH – тиоловая группа

- Nrf2 от англ. «Nuclear factor erythroid 2-related factor 2», транскрипционный ядерный фактор 2, связанный с эритроидным фактором 2
- Keap1- от англ. «Kelch-like ECH-associated protein 1», Kelch-подобный белок 1, ассоциированный с ЕСН
- ARE от англ. «Anti-oxidant response element», элемент антиоксидантного отклика
- GSH глутатион
- ПР пероксиредуктаза
- СР сульфиредоксин
- ЭПР электронно-парамагнитный резонанс
- СЛ спиновые ловушки
- ДПО 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид
- НТХ тетразолиум хлорид
- L-012 8-амино-5-хлор-7-фенилпиридо[3,4-d]пиридазин-1,4(2H, 3H) дион
- DCFH от англ. «2',7'-Dichlorodihydrofluorescein», 2',7'-

дихлордигидрофлуоресцеин

- DCF от англ. «Dichlorfluorescein», дихлорфлуоресцеин
- AR N-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин, коммерческое название «Amplex red»
- CTR1 от англ. «Copper transporter-1», транспортер меди 1
- СТR2 от англ. «Copper transporter-2», транспортер меди 2
- c-Abl тирозинкиназа, получившая название от англ. «Abelson murine leukemia viral oncogene homolog»
- MAPK от англ. «mitogen-activated protein kinases», митоген-активируемые протеинкиназы
- ERK от англ. «extracellular signal-related kinase», экстраклеточная сигналрегулирующая киназа
- PI3K от англ. «phosphatidylinositol 3-kinase», фосфатидилинозитол-3-киназа
- Akt протеинкиназа В, в англ. «Protein kinase В», РКВ
- СО стандартное отклонение

СОС – стандартная ошибка среднего

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matés J. M., Segura J. A., Alonso F. J., Márquez J. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update // Archives of toxicology. – 2012. – T. 86, № 11. – C. 1649-1665.

2. Pavlova N. N., Thompson C. B. The emerging hallmarks of cancer metabolism // Cell metabolism. -2016. - T. 23, No 1. - C. 27-47.

3. Harman D. A. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry // Journal of Gerontology. -1956. -T. 11, No 3. -C. 298-300.

4. Juntilla M. M., Patil V. D., Calamito M., Joshi R. P., Birnbaum M. J., Koretzky G. A. AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2010. – T. 115, No 20. – C. 4030-4038.

5. Owusu-Ansah E., Banerjee U. Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation // Nature. – 2009. – T. 461, № 7263. – C. 537-541.

6. Cairns R. A., Harris I. S., Mak T. W. Regulation of cancer cell metabolism // Nature Reviews Cancer. – 2011. – T. 11, № 2. – C. 85-95.

7. Mu W., Liu L. Reactive oxygen species signaling in cancer development // Reactive Oxygen Species. – 2017. – T. 4, № 10. – C. 251–265-251–265.

 Schieber M., Chandel N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress // Current biology. – 2014. – T. 24, № 10. – C. R453-R462.

9. Toyokuni S., Okamoto K., Yodoi J., Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer // FEBS letters. – 1995. – T. 358, № 1. – C. 1-3.

10. Zanetti M., Katusic Z. S., O'Brien T. Adenoviral-mediated overexpression of catalase inhibits endothelial cell proliferation // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. -2002. - T. 283, No 6. - C. H2620-H2626.

11. San Martin A., Griendling K. K. Redox control of vascular smooth muscle migration // Antioxidants & redox signaling. – 2010. – T. 12, № 5. – C. 625-640.

12. Polytarchou C., Hatziapostolou M., Papadimitriou E. Hydrogen peroxide stimulates proliferation and migration of human prostate cancer cells through activation of activator protein-1 and up-regulation of the heparin affin regulatory peptide gene // Journal of Biological Chemistry. -2005. - T. 280, No 49. - C. 40428-40435.

13. Burdon R. H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation // Free Radical Biology and Medicine. – 1995. – T. 18, No 4. – C. 775-794. 14. Qian Y., Luo J., Leonard S. S., Harris G. K., Millecchia L., Flynn D. C., Shi X. Hydrogen peroxide formation and actin filament reorganization by Cdc42 are essential for ethanol-induced *in vitro* angiogenesis // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – T. 278, No 18. – C. 16189-16197.

15. Arbiser J. L., Petros J., Klafter R., Govindajaran B., McLaughlin E. R., Brown L. F., Cohen C., Moses M., Kilroy S., Arnold R. S. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. - T. 99, No 2. - C. 715-720.

16. Mizutani H., Tada-Oikawa S., Hiraku Y., Kojima M., Kawanishi S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide // Life sciences. -2005. - T. 76, No 13. - C. 1439-1453.

17. Bretón-Romero R., Lamas S. Hydrogen peroxide signaling mediator in the activation of p38 MAPK in vascular endothelial cells // Methods in EnzymologyElsevier, 2013. – C. 49-59.

18. Ahmad K. A., Iskandar K. B., Hirpara J. L., Clement M.-V., Pervaiz S. Hydrogen peroxide-mediated cytosolic acidification is a signal for mitochondrial translocation of Bax during drug-induced apoptosis of tumor cells // Cancer research. – 2004. – T. 64, No 21. – C. 7867-7878.

19. Nishikawa M., Tamada A., Hyoudou K., Umeyama Y., Takahashi Y., Kobayashi Y., Kumai H., Ishida E., Staud F., Yabe Y. Inhibition of experimental hepatic metastasis by targeted delivery of catalase in mice // Clinical & experimental metastasis. – 2004. – T. 21,  $N_{2}$  3. – C. 213-221.

20. Nelson K. K., Ranganathan A. C., Mansouri J., Rodriguez A. M., Providence K. M., Rutter J. L., Pumiglia K., Bennett J. A., Melendez J. A. Elevated sod2 activity augments

matrix metalloproteinase expression: evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis // Clinical cancer research. -2003. - T. 9,  $N_{\rm P} 1. - C. 424-432$ .

21. Arnold R. S., Shi J., Murad E., Whalen A. M., Sun C. Q., Polavarapu R., Parthasarathy S., Petros J. A., Lambeth J. D. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1 // Proceedings of the National Academy of Sciences. -2001. - T. 98, No 10. - C. 5550-5555.

22. Ткачук В. А., Тюрин П. А., Кузьмин А. И., Белоусов В. В., Воротников А. В. Пероксид водорода как новый вторичный посредник. Биол. мембраны //. – 2012.

23. Veal E. A., Day A. M., Morgan B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling // Molecular cell. – 2007. – T. 26, № 1. – C. 1-14.

24. Stone J. R., Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger // Antioxidants & redox signaling. – 2006. – T. 8, № 3-4. – C. 243-270.

25. Rani V., Mishra S., Yadav T., Yadav U. C. S., Kohli S. Hydrogen peroxide sensing and signaling // Free Radicals in Human Health and DiseaseSpringer, 2015. – C. 105-116.

26. Lopez-Lázaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy // Cancer letters. -2007. - T. 252, No 1. -C. 1-8.

27. Lopez-Lazaro M. Hydrogen Peroxide // Encyclopedia of Cancer / Schwab M. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016. – C. 1-5.

28. Okon I. S., Zou M.-H. Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy // Pharmacological research. – 2015. – T. 100. – C. 170-174.

29. Mattson D. M., Ahmad I. M., Dayal D., Parsons A. D., Aykin-Burns N., Li L., Orcutt K. P., Spitz D. R., Dornfeld K. J., Simons A. L. Cisplatin combined with zidovudine enhances cytotoxicity and oxidative stress in human head and neck cancer cells via a thiol-dependent mechanism // Free Radical Biology and Medicine. – 2009. – T. 46, No 2. – C. 232-237.

30. Florea A.-M., Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects // Cancers. -2011. - T. 3,  $N \ge 1. - C.$  1351-1371.
31. Campbell biology. / Urry L. A., Cain M. L., Wasserman S. A., Minorsky P. V., Reece J. B.: Pearson Education, Incorporated, 2017.

32. Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation // cell. – 2011. – T. 144, No 5. – C. 646-674.

33. Abercrombie M. Contact inhibition in tissue culture // *In vitro*. – 1970. – T. 6, № 2.
– C. 128-142.

34. Surget S., Khoury M. P., Bourdon J.-C. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective // OncoTargets and therapy. – 2014. – T. 7. – C. 57.

35. Li T., Kon N., Jiang L., Tan M., Ludwig T., Zhao Y., Baer R., Gu W. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence // cell. – 2012. – T. 149, Nº 6. – C. 1269-1283.

36. Kruiswijk F., Labuschagne C. F., Vousden K. H. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill // Nature reviews Molecular cell biology. -2015. - T. 16, No 7. - C. 393-405.

37. Warburg O. On the origin of cancer cells // Science. – 1956. – T. 123, № 3191. – C. 309-314.

38. Kaelin W. G., Thompson C. B. Clues from cell metabolism // Nature. – 2010. – T.
465, № 7298. – C. 562-564.

39. Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression // The oncologist. -2004. - T. 9, No suppl\_ 5. -C. 10-17.

40. Yang J., Weinberg R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis // Developmental cell. -2008. - T. 14, No 6. - C. 818-829.

41. Vesuna F., Winnard P., Raman V., Glackin C. Twist overexpression promotes chromosomal instability in the breast cancer cell line MCF-7 // Cancer genetics and cytogenetics.  $-2006. - T. 167, N_{2}2. - C. 189-191.$ 

42. Sieber O. M., Heinimann K., Tomlinson I. P. Genomic instability—the engine of tumorigenesis? // Nature Reviews Cancer. – 2003. – T. 3, № 9. – C. 701-708.

43. Mironchik Y., Winnard P. T., Vesuna F., Kato Y., Wildes F., Pathak A. P., Kominsky S., Artemov D., Bhujwalla Z., Van Diest P. Twist overexpression induces *in vivo* angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer // Cancer research. – 2005. – T. 65, No 23. – C. 10801-10809.

44. Klionsky D. J. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve // Autophagy. -2008. - T. 4, No 6. - C. 740-743.

45. Xie Z., Klionsky D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations // Nature cell biology. – 2007. – T. 9, № 10. – C. 1102-1109.

46. Mizushima N., Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues // cell. – 2011. – T. 147, № 4. – C. 728-741.

47. Kobayashi S. Choose delicately and reuse adequately: the newly revealed process of autophagy // Biological and Pharmaceutical Bulletin. -2015. - T. 38, No 8. -C. 1098-1103.

48. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Chapter 18 Apoptosis: programmed cell death eliminates unwanted cells // Molecular Biology of the Cell (Textbook). 5th ed. New York: Garland Science. – 2008. – T. 1115.

49. Raychaudhuri S. A minimal model of signaling network elucidates cell-to-cell stochastic variability in apoptosis // PLoS One. – 2010. – T. 5, No 8. – C. e11930.

50. Majno G., Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death // The American journal of pathology. -1995. - T. 146, No 1. - C. 3.

51. Kroemer G., El-Deiry W., Golstein P., Peter M., Vaux D., Vandenabeele P., Zhivotovsky B., Blagosklonny M., Malorni W., Knight R. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death // Cell death and differentiation. -2005. - T. 12, No 12. - C. 1463-1467.

52. Shimizu A., Masuda Y., Kitamura H., Ishizaki M., Ohashi R., Sugisaki Y., Yamanaka N. Complement-mediated killing of mesangial cells in experimental glomerulonephritis: cell death by a combination of apoptosis and necrosis // Nephron. – 2000. – T. 86, N 2. – C. 152-160.

53. Proskuryakov S. Y., Konoplyannikov A. G., Gabai V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? // Experimental cell research. – 2003. – T. 283, № 1. – C. 1-16.

54. Гибель клетки (апоптоз). / Лушников Е. Ф., Абросимов А. Ю.: Медицина, 2001.

55. Reznikov K., Kolesnikova L., Pramanik A., Tan-No K., Gileva I., Yakovleva T., Rigler R., Terenius L., Bakalkin G. Clustering of apoptotic cells via bystander killing by peroxides // The FASEB Journal. -2000. - T. 14, No 12. -C. 1754-1764.

56. Pletjushkina O. Y., Fetisova E., Lyamzaev K., Ivanova O. Y., Domnina L., Vyssokikh M. Y., Pustovidko A., Vasiliev J., Murphy M., Chernyak B. Long-distance apoptotic killing of cells is mediated by hydrogen peroxide in a mitochondrial ROS-dependent fashion // Cell Death & Differentiation. – 2005. – T. 12, No 11. – C. 1442-1444.

57. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S. A., Abrams J. M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E. S., Altucci L., Amelio I., Andrews D. W. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 // Cell Death & Differentiation. -2018. - T. 25, No 3. - C. 486-541.

58. Roninson I. B., Broude E. V., Chang B.-D. If not apoptosis, then what? Treatmentinduced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells // Drug Resistance Updates. – 2001. - T. 4, No 5. - C. 303-313.

59. Castedo M., Perfettini J.-L., Roumier T., Andreau K., Medema R., Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition // Oncogene. – 2004. – T. 23, № 16. – C. 2825-2837.

60. Манских В. Н. К вопросу о механизмах образования микроядер в соматических клетках бесхвостых амфибий в норме и при действии N-нитрозо-N-метилкарбамида // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 2. – С. 217-220.

61. Матвеева Н. Ю. Апоптоз: морфологические особенности и молекулярные механизмы // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2003. № 4.

62. Locksley R. M., Killeen N., Lenardo M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology // cell. – 2001. – T. 104,  $N_{2}$  4. – C. 487-501.

63. Барышников А. ю., Шишкин ю. В // Воок ю., Шишкин ю. В / ЕditorИммунологические проблемы апоптоза. М.: Эдиториал УРСС, 2002.

64. Ashkenazi A., Dixit V. M. Death receptors: signaling and modulation // Science. – 1998. – C. 1305-1308.

65. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis // Molecular cell. -2002. - T. 9, No 3. - C. 459-470.

66. Самуилов В., Олескин А., Лагунова Е. Программируемая клеточная смерть // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 8. – С. 1029-1046.

67. Кэперон М., Льюин Б. Клетки //. – 2011.

68. Wei M. C., Zong W.-X., Cheng E. H.-Y., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A. J., Roth K. A., MacGregor G. R., Thompson C. B., Korsmeyer S. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death // Science. -2001. - T. 292, No 5517. - C. 727-730.

69. Antonsson B., Montessuit S., Sanchez B., Martinou J.-C. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells // Journal of Biological Chemistry. -2001. - T. 276, No 15. -C. 11615-11623.

70. Lindsten T., Ross A. J., King A., Zong W.-X., Rathmell J. C., Shiels H. A., Ulrich E., Waymire K. G., Mahar P., Frauwirth K. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues // Molecular cell. – 2000. – T. 6,  $N_{2}$  6. – C. 1389-1399.

71. Yamamuro A., Kishino T., Ohshima Y., Yoshioka Y., Kimura T., Kasai A., Maeda S. Caspase-4 directly activates caspase-9 in endoplasmic reticulum stress–induced apoptosis in SH-SY5Y cells // Journal of pharmacological sciences. – 2011. – C. 1101240503-1101240503.

72. Pallepati P., Averill-Bates D. A. Activation of ER stress and apoptosis by hydrogen peroxide in HeLa cells: protective role of mild heat preconditioning at 40 C //

Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2011. – T. 1813, № 12. – C. 1987-1999.

73. Morishima N., Nakanishi K., Takenouchi H., Shibata T., Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12 // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – T. 277, No 37. – C. 34287-34294.

74. Rao R. Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, and Ellerby HM // Couple endoplasmic reticulum stress to the cell death program: an Apaf-1-independent intrinsic pathway. J Biol Chem. – 2002. – T. 277. – C. 21836-21842.

75. Barry M. A., Behnke C. A., Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia // Biochemical pharmacology. -1990. - T. 40, No 10. - C. 2353-2362.

76. Fesus L., Davies P. A., Piacentini M. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death // European journal of cell biology. – 1991. – T. 56, № 2. – C. 170-177.

77. Halestrap A. P. What is the mitochondrial permeability transition pore? // Journal of molecular and cellular cardiology. -2009. - T. 46, No 6. - C. 821-831.

78. Martinou J.-C., Desagher S., Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing // Nature cell biology. -2000. - T. 2, No 3. - C. E41-E43.

79. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // Biochemical Journal. – 1999. – T. 341, No 2. – C. 233-249.

80. Bras M., Queenan B., Susin S. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying // Biochemistry (Moscow). – 2005. – T. 70, № 2. – C. 231-239.

81. Gunter T. E., Yule D. I., Gunter K. K., Eliseev R. A., Salter J. D. Calcium and mitochondria // FEBS letters. – 2004. – T. 567, № 1. – C. 96-102.

82. Crompton M., Barksby E., Johnson N., Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death // Biochimie. -2002. - T. 84,  $N_{2} 2-3. - C. 143-152.$ 

83. Скулачев В. П. Явления запрограмированной смерти. Митохондриии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // Соросовский образовательный журнал. – 2001. № 6. – С. 4-10.

84. Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor // Nature. – 1999. – T. 397, № 6718. – C. 441-446.

85. Van der Pol E., Böing A., Gool E., Nieuwland R. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles // Journal of thrombosis and haemostasis. -2016. - T. 14, No 1. - C. 48-56.

86. Hogue M. J. The effect of hypotonic and hypertonic solutions on fibroblasts of the embryonic chick heart *in vitro* // The Journal of experimental medicine. -1919. - T. 30,  $N_{\rm D} 6. - C. 617$ .

87. Charras G. A short history of blebbing // Journal of microscopy. – 2008. – T. 231, No 3. - C.466-478.

88. Tixeira R., Caruso S., Paone S., Baxter A. A., Atkin-Smith G. K., Hulett M. D., Poon I. K. Defining the morphologic features and products of cell disassembly during apoptosis // Apoptosis. – 2017. – T. 22,  $N_{2}$  3. – C. 475-477.

89. Zeng W., Wang X., Xu P., Liu G., Eden H. S., Chen X. Molecular imaging of apoptosis: from micro to macro // Theranostics. -2015. - T. 5,  $N_{2} 6. - C. 559$ .

90. Waterhouse N., Kumar S., Song Q., Strike P., Sparrow L., Dreyfuss G., Alnemri E. S., Litwack G., Lavin M., Watters D. Heteronuclear ribonucleoproteins C1 and C2, components of the spliceosome, are specific targets of interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme-like proteases in apoptosis // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – T. 271, No 46. – C. 29335-29341.

91. Poręba M., Stróżyk A., Salvesen G. S., Drąg M. Caspase substrates and inhibitors // Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2013. – T. 5, № 8. – C. a008680.

92. Chang H. Y., Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases // Microbiology and molecular biology reviews. -2000. - T. 64, No 4. - C. 821-846.

93. Boatright K. M., Salvesen G. S. Mechanisms of caspase activation // Current opinion in cell biology. – 2003. – T. 15, № 6. – C. 725-731.

94. Agniswamy J., Fang B., Weber I. T. Plasticity of S2–S4 specificity pockets of executioner caspase-7 revealed by structural and kinetic analysis // The FEBS journal. – 2007. – T. 274, № 18. – C. 4752-4765.

95. Li P., Nijhawan D., Wang X. Mitochondrial activation of apoptosis // cell. – 2004. –
T. 116. – C. S57-S61.

96. Katunuma N., Matsui A., Le Q., Utsumi K., Salvesen G., Ohashi A. Novel procaspase-3 activating cascade mediated by lysoapoptases and its biological significances in apoptosis // Advances in enzyme regulation. -2001. - T. 1, No 41. - C. 237-250.

97. Gallaher B., Hille R., Raile K., Kiess W. Apoptosis: live or die-hard work either way! // Hormone and Metabolic Research. – 2001. – T. 33, № 09. – C. 511-519.

98. Crowley L. C., Waterhouse N. J. Detecting cleaved caspase-3 in apoptotic cells by flow cytometry // Cold Spring Harbor Protocols. – 2016. – T. 2016, № 11. – C. pdb. prot087312.

99. Stratos I., Li Z., Rotter R., Herlyn P., Mittlmeier T., Vollmar B. Inhibition of caspase mediated apoptosis restores muscle function after crush injury in rat skeletal muscle // Apoptosis. – 2012. – T. 17,  $N_{2}$  3. – C. 269-277.

100. Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view // Protein science. -2004. - T. 13, No 8. - C. 1979-1987.

101. Злобовская О. А., Ширманова М. В., Ковалева Т. Ф., Саркисян К. С., Загайнова Е. В., Лукьянов К. А. Сенсоры активности каспаз // Биоорганическая химия. – 2019. – Т. 45, № 1. – С. 17-26.

102. Yoshikawa S., Muramoto K., Shinzawa-Itoh K., Aoyama H., Tsukihara T., Shimokata K., Katayama Y., Shimada H. Proton pumping mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2006. – T. 1757, № 9-10. – C. 1110-1116.

103. Neupert W. Protein import into mitochondria // Annual review of biochemistry. –
1997. – T. 66, № 1. – C. 863-917.

104. Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis // Annual review of physiology. – 1998. – T. 60,  $N_{\rm P}$  1. – C. 619-642.

105. Waterhouse N., Trapani J. A new quantitative assay for cytochrome c release in apoptotic cells // Cell Death & Differentiation. – 2003. – T. 10, № 7. – C. 853-855.

106. Loo J. F., Lau P., Ho H., Kong S. An aptamer-based bio-barcode assay with isothermal recombinase polymerase amplification for cytochrome-c detection and anti-cancer drug screening // Talanta. -2013. - T. 115. - C. 159-165.

107. Xu J., Hao Z., Gou X., Tian W., Jin Y., Cui S., Guo J., Sun Y., Wang Y., Xu Z. Imaging of reactive oxygen species burst from mitochondria using laser scanning confocal microscopy // Microscopy research and technique. -2013. - T. 76, No 6. - C. 612-617.

108. Morganti C., Bonora M., Ito K. Improving the accuracy of flow cytometric assessment of mitochondrial membrane potential in hematopoietic stem and progenitor cells through the inhibition of efflux pumps // JoVE (Journal of Visualized Experiments). – 2019. No 149. – C. e60057.

109. Monteith A., Marszalec W., Chan P., Logan J., Yu W., Schwarz N., Wokosin D., Hockberger P. Imaging of mitochondrial and non-mitochondrial responses in cultured rat hippocampal neurons exposed to micromolar concentrations of TMRM // PLoS One. -2013. - T. 8, No 3. - C. e58059.

110. Schlegel R., Williamson P. Phosphatidylserine, a death knell // Cell Death & Differentiation. – 2001. – T. 8, № 6. – C. 551-563.

111. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutellingsperger C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V // Journal of immunological methods. – 1995. – T. 184,  $N_{\rm D}$  1. – C. 39-51.

112. Meers P., Mealy T. Phospholipid determinants for annexin V binding sites and the role of tryptophan 187 // Biochemistry. – 1994. – T. 33, № 19. – C. 5829-5837.

113. Brumatti G., Sheridan C., Martin S. J. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells // Methods. – 2008. – T. 44,  $N_{2}$  3. – C. 235-240.

114. The T., Feltkamp T. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies: I. Experiments on the conditions of conjugation // Immunology. -1970. - T. 18, No 6. - C. 865.

115. Stewart S. E., Ashkenazi A., Williamson A., Rubinsztein D. C., Moreau K. Transbilayer phospholipid movement facilitates the translocation of annexin across membranes // Journal of cell science. -2018. - T. 131, No 14.

116. Boersma H. H., Kietselaer B. L., Stolk L. M., Bennaghmouch A., Hofstra L., Narula J., Heidendal G. A., Reutelingsperger C. P. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications // Journal of nuclear medicine. – 2005. – T. 46, No 12. – C. 2035-2050.

117. Gaforio J., Serrano M., Algarra I., Ortega E., Alvarez de Cienfuegos G. Phagocytosis of apoptotic cells assessed by flow cytometry using 7-Aminoactinomycin D // Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology. – 2002. – T. 49,  $N_{2}$  1. – C. 8-11.

118. Lizarbe M. A., Barrasa J. I., Olmo N., Gavilanes F., Turnay J. Annexinphospholipid interactions. Functional implications // International journal of molecular sciences. -2013. -T. 14, No 2. -C. 2652-2683.

119. Collins J. A., Schandl C. A., Young K. K., Vesely J., Willingham M. C. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis // Journal of Histochemistry & Cytochemistry. – 1997. – T. 45, № 7. – C. 923-934.

120. Bortner C. D., Oldenburg N. B., Cidlowski J. A. The role of DNA fragmentation in apoptosis // Trends in cell biology. – 1995. – T. 5, № 1. – C. 21-26.

121. Lozano G. M., BEJARANO I., ESPINO J., GONZÁLEZ D., ORTIZ Á., GARCÍA J. F., RODRÍGUEZ A. B., PARIENTE J. A. Density gradient capacitation is the most suitable method to improve fertilization and to reduce DNA fragmentation positive spermatozoa of infertile men // Anatolian Journal of Obstetrics & Gynecology. – 2009. – T. 1,  $N_{2}$  3.

122. Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H., Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells // Experimental cell research. -1993. - T. 207, N = 1. - C. 202-205.

123. Negoescu A., Guillermet C., Lorimier P., Brambilla E., Labat-Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity // Biomedicine & pharmacotherapy. – 1998. – T. 52,  $N_{\rm P}$  6. – C. 252-258.

124. Li X., Darzynkiewicz Z. Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation // Cell Proliferation. – 1995. – T. 28, № 11. – C. 571-579.

125. Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation // Cellular physiology and biochemistry. -2001. - T. 11, No 4. -C. 173-186.

126. Владимиров Ю. А., Азизова О. А., Деев А. И., Козлов А. В. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – 1991. – Т. 29, № 1. – С. 1.

127. Cheeseman K., Slater T. An introduction to free radical biochemistry // British medical bulletin. – 1993. – T. 49, № 3. – C. 481-493.

128. Донцов В., Крутько В., Мрикаев Б., Уханов С. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении // Труды Института системного анализа Российской академии наук. – 2006. – Т. 19. – С. 50-69.

129. Naudi A., Jove M., Ayala V., Cassanye A., Serrano J., Gonzalo H., Boada J., Prat J., Portero-Otin M., Pamplona R. Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress // Experimental diabetes research. – 2012. – T. 2012.

130. Archer S. L., Gomberg-Maitland M., Maitland M. L., Rich S., Garcia J. G., Weir E. K. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 $\alpha$ -Kv1. 5 O2-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and

cancer // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2008. – T. 294, № 2. – C. H570-H578.

131. Addabbo F., Montagnani M., Goligorsky M. S. Mitochondria and reactive oxygen species // Hypertension. – 2009. – T. 53, № 6. – C. 885-892.

132. Ott M., Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death // Apoptosis. – 2007. – T. 12, № 5. – C. 913-922.

133. St-Pierre J., Buckingham J. A., Roebuck S. J., Brand M. D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain // Journal of Biological Chemistry. -2002. - T. 277, No 47. - C. 44784-44790.

134. Зайцев В. Г., Закревский В. И. Методологические аспекты исследований свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // Вестник Волгоградской медицинской академии. – 1998. – Т. 54, № 4. – С. 49-53.

135. Sena L. A., Chandel N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species // Molecular cell. -2012. -T. 48, No 2. -C. 158-167.

136. Zangar R. C., Davydov D. R., Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450 // Toxicology and applied pharmacology. -2004. - T. 199, No 3. - C. 316-331.

137. Active oxygen in chemistry. / Foote C. S., Valentine J. S., Greenberg A., Liebman J. F.: Springer Science & Business Media, 2012.

138. Осипов А. Н., Азизова О. А., Владимиров Ю. А. Активные формы кислорода и их роль в организме // Успехи биол. химии. – 1990. – Т. 31, № 2. – С. 180-208.

139. Miyamoto S., Ronsein G. E., Corrêa T. C., Martinez G. R., Medeiros M. H., Di Mascio P. Direct evidence of singlet molecular oxygen generation from peroxynitrate, a decomposition product of peroxynitrite // Dalton Transactions. – 2009. № 29. – C. 5720-5729.

140. Goldstein S., Czapski G. Formation of peroxynitrate from the reaction of peroxynitrite with CO2: Evidence for carbonate radical production // Journal of the American Chemical Society. – 1998. – T. 120, No 14. – C. 3458-3463.

141. Riethmüller M., Burger N., Bauer G. Singlet oxygen treatment of tumor cells triggers extracellular singlet oxygen generation, catalase inactivation and reactivation of

intercellular apoptosis-inducing signaling // Redox biology. – 2015. – T. 6. – C. 157-168.

142. Di Mascio P., Bechara E. J., Medeiros M. H., Briviba K., Sies H. Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide // FEBS letters. – 1994. – T. 355,  $N_{2}$  3. – C. 287-289.

143. Held A., Halko D., Hurst J. Mechanisms of chlorine oxidation of hydrogen peroxide // Journal of the American Chemical Society. – 1978. – T. 100, № 18. – C. 5732-5740.

144. Bauer G. HOCl-dependent singlet oxygen and hydroxyl radical generation modulate and induce apoptosis of malignant cells // Anticancer research. -2013. - T. 33, No 9. -C. 3589-3602.

145. Miyamoto S., Ronsein G. E., Prado F. M., Uemi M., Corre^a T. C., Toma I. N., Bertolucci A., Oliveira M. C., Motta F. D., Medeiros M. H. Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation // IUBMB life. – 2007. – T. 59, № 4-5. – C. 322-331.

146. Miyamoto S., Martinez G. R., Martins A. P. B., Medeiros M. H., Di Mascio P. Direct evidence of singlet molecular oxygen [O2  $(1\Delta g)$ ] production in the reaction of linoleic acid hydroperoxide with peroxynitrite // Journal of the American Chemical Society. – 2003. – T. 125, No 15. – C. 4510-4517.

147. WEFERS H., SIES H. Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen // European Journal of Biochemistry. -1983. - T. 137, No 1-2. -C. 29-36.

148. Ogilby P. R. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun // Chemical Society Reviews. -2010. - T. 39, No 8. -C. 3181-3209.

149. Kehrer J. P., Klotz L.-O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health // Critical reviews in toxicology. – 2015. – T. 45, No 9. – C. 765-798.

150. Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death // Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2005. – T. 2, No 1. – C. 1-23.

151. Zhou Z., Song J., Tian R., Yang Z., Yu G., Lin L., Zhang G., Fan W., Zhang F., Niu G. Activatable singlet oxygen generation from lipid hydroperoxide nanoparticles for cancer therapy // Angewandte Chemie. – 2017. – T. 129, № 23. – C. 6592-6596.

152. Krasnovsky A., Douglas R., Moan J., Ronto G. Light in biology and medicine // Book Light in biology and medicine / EditorPlenum Press, New York, 1991.

153. Bauer G. Autoamplificatory singlet oxygen generation sensitizes tumor cells for intercellular apoptosis-inducing signaling // Mechanisms of ageing and development. – 2018. – T. 172. – C. 59-77.

154. Agnez-Lima L. F., Melo J. T., Silva A. E., Oliveira A. H. S., Timoteo A. R. S., Lima-Bessa K. M., Martinez G. R., Medeiros M. H., Di Mascio P., Galhardo R. S. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms // Mutation Research/Reviews in Mutation Research. -2012. - T. 751,  $N_{\rm P} 1. - C. 15-28$ .

155. Singlet oxygen reactions with organic compounds and polymers. / Rånby B. G., Rabek J. F.: John Wiley & Sons, 1978.

156. Nosaka Y., Nosaka A. Y. Generation and detection of reactive oxygen species in photocatalysis // Chemical reviews. – 2017. – T. 117, № 17. – C. 11302-11336.

157. Bedard K., Krause K.-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology // Physiological reviews. -2007. - T. 87,  $N \ge 1. - C.$  245-313.

158. Babior B. M., Kipnes R. S., Curnutte J. T. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent // The Journal of clinical investigation. -1973. - T. 52, No 3. - C. 741-744.

159. Hayyan M., Hashim M. A., AlNashef I. M. Superoxide ion: generation and chemical implications // Chemical reviews. – 2016. – T. 116, № 5. – C. 3029-3085.

160. Sullivan L. B., Chandel N. S. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer // Cancer & metabolism. -2014. - T. 2, No 1. - C. 17.

161. Muller F. L., Liu Y., Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – T. 279, № 47. – C. 49064-49073.

162. Fisher A. B. Redox signaling across cell membranes // Antioxidants & redox signaling. – 2009. – T. 11, № 6. – C. 1349-1356.

163. Brand M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production // Experimental gerontology. – 2010. – T. 45, № 7-8. – C. 466-472.

164. Koppenol W. H. The Haber-Weiss cycle–70 years later // Redox Report. – 2001. –
T. 6, № 4. – C. 229-234.

165. Luis A., Sandalio L. M., Palma J., Bueno P., Corpas F. J. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications // Free Radical Biology and Medicine.
– 1992. – T. 13, № 5. – C. 557-580.

166. Gligorovski S., Strekowski R., Barbati S., Vione D. Environmental implications of hydroxyl radicals (• OH) // Chemical reviews. – 2015. – T. 115, № 24. – C. 13051-13092.

167. Quan L. J., Zhang B., Shi W. W., Li H. Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network // Journal of Integrative Plant Biology. -2008. - T. 50, No 1. - C. 2-18.

168. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species // Journal of Cell Biology. -2011. - T. 194, No 1. - C. 7-15.

169. Glasauer A., Chandel N. S. Targeting antioxidants for cancer therapy // Biochemical pharmacology. -2014. - T. 92, No 1. - C. 90-101.

170. Ray P. D., Huang B.-W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling // Cellular signalling. -2012. - T. 24, No 5. - C. 981-990.

171. Ghosh A., Greenberg M. E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences // Science. – 1995. – T. 268, № 5208. – C. 239-247.

172. Заводник И. Б. Митохондрии, кальциевый гомеостаз и кальциевая сигнализация // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62, № 3. – С. 311-317.

173. Miquel J., Economos A., Fleming J., Johnson Jr J. Mitochondrial role in cell aging // Experimental gerontology. – 1980. – T. 15, № 6. – C. 575-591.

174. Осипов А., Азизова О., Владимиров Ю. Активные формы кислорода и их роль в организме // Успехи биол. химии. – 1990. – Т. 31, № 2. – С. 180-208.

175. Zhang J., Wang X., Vikash V., Ye Q., Wu D., Liu Y., Dong W. ROS and ROSmediated cellular signaling // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2016. – T. 2016.

176. Covarrubias L., Hernández-García D., Schnabel D., Salas-Vidal E., Castro-Obregón S. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? // Developmental biology. -2008. - T. 320,  $N_{2} 1. - C. 1-11$ .

177. Tamborindeguy M. T., Matte B. F., Ramos G. d. O., Alves A. M., Bernardi L., Lamers M. L. NADPH-oxidase-derived ROS alters cell migration by modulating adhesions dynamics // Biology of the Cell. – 2018. – T. 110, No 10. – C. 225-236.

178. Burhans W. C., Weinberger M. DNA replication stress, genome instability and aging // Nucleic acids research. – 2007. – T. 35, № 22. – C. 7545-7556.

179. Khandrika L., Kumar B., Koul S., Maroni P., Koul H. K. Oxidative stress in prostate cancer // Cancer letters. – 2009. – T. 282, № 2. – C. 125-136.

180. Khansari N., Shakiba Y., Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer // Recent patents on inflammation & allergy drug discovery. -2009. - T. 3,  $N_{\rm P} 1. - C. 73-80$ .

181. Akhtar M. J., Ahamed M., Kumar S., Khan M. M., Ahmad J., Alrokayan S. A. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species // International journal of nanomedicine. -2012. - T. 7. - C. 845.

182. Azad M. B., Chen Y., Gibson S. B. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment // Antioxidants & redox signaling. -2009. - T. 11, No 4. -C. 777-790.

183. Circu M., Aw T. Reactive oxygen species, antioxidant redox systems, and apoptosis // Free Rad. Biol. Med. – 2010. – T. 48. – C. 749-762.

184. Adjuik M., Babiker A., Garner P., Olliaro P., Taylor W., White N. International Artemisinin Study G // Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. Lancet. – 2004. – T. 363. – C. 9-17.

185. Efferth T. Molecular pharmacology and pharmacogenomics of artemisinin and its derivatives in cancer cells // Current drug targets. -2006. - T. 7, No 4. - C. 407-421.

186. Davies K. J. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress // IUBMB life. – 1999. – T. 48,  $N_{2}$  1. – C. 41-47.

187. Matés J. M., Sánchez-Jiménez F. M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy // The international journal of biochemistry & cell biology. -2000. - T. 32, No 2. -C. 157-170.

188. Amri F., Ghouili I., Amri M., Carrier A., Masmoudi-Kouki O. Neuroglobin protects astroglial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptotic cell death // Journal of neurochemistry. -2017. - T. 140, No 1. - C. 151-169.

189. Kong Q., Beel J., Lillehei K. A threshold concept for cancer therapy // Medical hypotheses. – 2000. – T. 55, № 1. – C. 29-35.

190. Matsuzawa A., Ichijo H. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 2008. – T. 1780, № 11. – C. 1325-1336.

191. Schulze-Osthoff K., Beyaert R., Vandevoorde V., Haegeman G., Fiers W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF // The EMBO journal. – 1993. – T. 12, No 8. – C. 3095-3104.

192. Kamata H., Honda S.-i., Maeda S., Chang L., Hirata H., Karin M. Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases // cell. – 2005. – T. 120, No 5. – C. 649-661.

193. Banki K., Hutter E., Gonchoroff N. J., Perl A. Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling // The Journal of Immunology. – 1999. – T. 162,  $N_{2}$  3. – C. 1466-1479.

194. Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Decaudin D., Macho A., Hirsch T., Susin S. A., Petit P. X., Mignotte B., Kroemer G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death // The Journal of experimental medicine. – 1995. – T. 182, No 2. – C. 367-377.

195. Friesen C., Fulda S., Debatin K.-M. Induction of CD95 ligand and apoptosis by doxorubicin is modulated by the redox state in chemosensitive-and drug-resistant tumor cells // Cell Death & Differentiation. – 1999. – T. 6, No 5. – C. 471-480.

196. Ribeiro I., Olliaro P. Safety of artemisinin and its derivatives. A review of published and unpublished clinical trials // Medecine tropicale: revue du Corps de sante colonial. – 1998. – T. 58,  $N_{2}$  3 Suppl. – C. 50-53.

197. Schulze-Bergkamen H., Krammer P. H. Apoptosis in cancer—implications for therapy // Seminars in oncology. – T. 31 –Elsevier, 2004. – C. 90-119.

198. Debatin K.-M., Krammer P. H. Death receptors in chemotherapy and cancer // Oncogene. – 2004. – T. 23, № 16. – C. 2950-2966.

199. Dell'Eva R., Pfeffer U., Vené R., Anfosso L., Forlani A., Albini A., Efferth T. Inhibition of angiogenesis *in vivo* and growth of Kaposi's sarcoma xenograft tumors by the anti-malarial artesunate // Biochemical pharmacology. – 2004. – T. 68, N 12. – C. 2359-2366.

200. Gorman A., McGowan A., Cotter T. G. Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis // FEBS letters. – 1997. – T. 404, № 1. – C. 27-33.

201. Müller I., Niethammer D., Bruchelt G. Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity // International journal of molecular medicine. – 1998. – T. 1, № 2. – C. 491-495.

202. Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death // Toxicology letters. – 2004. – T. 149, № 1-3. – C. 19-23.

203. Efferth T., Giaisi M., Merling A., Krammer P. H., Li-Weber M. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells // PLoS One. – 2007. – T. 2,  $N_{2}$  8. – C. e693.

204. Leach J. K., Van Tuyle G., Lin P.-S., Schmidt-Ullrich R., Mikkelsen R. B. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen // Cancer research. -2001. - T. 61, No 10. - C. 3894-3901.

205. Prise K. M., O'sullivan J. M. Radiation-induced by stander signalling in cancer therapy // Nature Reviews Cancer. -2009. - T. 9, No 5. -C. 351-360.

206. Trachootham D., Alexandre J., Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? // Nature reviews Drug discovery. – 2009. – T. 8, № 7. – C. 579-591.

207. Gilliam L. A., Moylan J. S., Patterson E. W., Smith J. D., Wilson A. S., Rabbani Z., Reid M. B. Doxorubicin acts via mitochondrial ROS to stimulate catabolism in C2C12 myotubes // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2012. – T. 302,  $N_{\rm P}$  1. – C. C195-C202.

208. Lo Y.-L., Wang W. Formononetin potentiates epirubicin-induced apoptosis via ROS production in HeLa cells *in vitro* // Chemico-biological interactions. – 2013. – T. 205, No 3. - C. 188-197.

209. Eskelinen E.-L. New insights into the mechanisms of macroautophagy in mammalian cells // International review of cell and molecular biology. -2008. - T. 266. - C. 207-247.

210. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity // Pharmacological reviews. -2004. - T. 56, No 2. -C. 185-229.

211. Yamada T., Egashira N., Imuta M., Yano T., Yamauchi Y., Watanabe H., Oishi R. Role of oxidative stress in vinorelbine-induced vascular endothelial cell injury // Free Radical Biology and Medicine. -2010. - T. 48, No 1. - C. 120-127.

212. Basu A., Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage // Journal of nucleic acids. – 2010. – T. 2010.

213. Belyanskaya L. L., Hopkins-Donaldson S., Kurtz S., Simões-Wüst A. P., Yousefi S., Simon H. U., Stahel R., Zangemeister-Wittke U. Cisplatin activates Akt in small cell lung cancer cells and attenuates apoptosis by survivin upregulation // International journal of cancer. -2005. - T. 117, No 5. -C. 755-763.

214. Blair B. G., Larson C. A., Safaei R., Howell S. B. Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin // Clinical cancer research. -2009. - T. 15, No 13. - C. 4312-4321.

215. Cepeda V., Fuertes M. A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Pérez J. M. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity // Anti-Cancer Agents in Medicinal

Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). – 2007. – T. 7, № 1. – C. 3-18.

216. Cui W., Yazlovitskaya E. M., Mayo M. S., Pelling J. C., Persons D. L. Cisplatininduced response of c-jun N-terminal kinase 1 and extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in a series of cisplatin-resistant ovarian carcinoma cell lines // Molecular carcinogenesis. – 2000. – T. 29,  $N_{\rm P}$  4. – C. 219-228.

217. Kruidering M., Van De Water B., De Heer E., Mulder G. J., Nagelkerke J. F. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. -1997. - T. 280, No 2. -C. 638-649.

218. Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. / Lippert B.: John Wiley & Sons, 1999.

219. Marullo R., Werner E., Degtyareva N., Moore B., Altavilla G., Ramalingam S. S., Doetsch P. W. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions // PLoS One. -2013. - T. 8,  $N_{2} 11. - C. e81162$ .

220. Icsel C., Yilmaz V. T., Aygun M., Cevatemre B., Alper P., Ulukaya E. Palladium (II) and platinum (II) saccharinate complexes with bis (diphenylphosphino) methane/ethane: synthesis, S-phase arrest and ROS-mediated apoptosis in human colon cancer cells // Dalton Transactions. -2018. - T. 47, No 33. - C. 11397-11410.

221. Tabrizi L., Chiniforoshan H. Cytotoxicity and cellular response mechanisms of water-soluble platinum (II) complexes of lidocaine and phenylcyanamide derivatives // BioMetals. -2017. - T. 30, No 1. - C. 59-70.

222. Chen F., Wang X., Jin X., Zhao J., Gou S. Oxidative DNA double strand breaks and autophagy in the antitumor effect of sterically hindered platinum (II) complexes in NSCLCs // Oncotarget. – 2017. – T. 8,  $N_{2}$  19. – C. 30933.

223. Wu Y. J., Muldoon L. L., Neuwelt E. A. The chemoprotective agent N-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2005. – T. 312,  $N_{2}$  2. – C. 424-431.

224. Galluzzi L., Maiuri M., Vitale I., Zischka H., Castedo M., Zitvogel L., Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications // Cell death and differentiation. -2007. - T. 14, No 7. -C. 1237.

225. Dondorp A. M., Fanello C. I., Hendriksen I. C., Gomes E., Seni A., Chhaganlal K. D., Bojang K., Olaosebikan R., Anunobi N., Maitland K. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial // The Lancet. – 2010. – T. 376, No 9753. – C. 1647-1657.

226. Gottlieb E., Vander Heiden M. G., Thompson C. B. Bcl-xL prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis // Molecular and cellular biology. -2000. - T. 20, No 15. - C. 5680-5689.

227. Lennicke C., Rahn J., Lichtenfels R., Wessjohann L. A., Seliger B. Hydrogen peroxide–production, fate and role in redox signaling of tumor cells // Cell Communication and Signaling. -2015. - T. 13,  $N_{2} 1. - C. 1-19$ .

228. Manda G., Nechifor M. T., Neagu T.-M. Reactive oxygen species, cancer and anticancer therapies // Current Chemical Biology. – 2009. – T. 3, № 1. – C. 22-46.

229. Зенков Н., Меньщикова Е., Шергин С. Окислительный стресс. Диагностика, терапия, профилактика //. – 1993.

230. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas // Journal of Biological Chemistry. – 1989. – T. 264, № 14. – C. 7761-7764.

231. Folz R. J., Crapo J. D. Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene // Genomics. – 1994. – T. 22,  $N_{2}$  1. – C. 162-171.

232. McCord J. M., Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein) // Journal of Biological Chemistry. – 1969. – T. 244, № 22. – C. 6049-6055.

233. Lambeth J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen // Nature Reviews Immunology. -2004. - T. 4, No 3. - C. 181-189.

234. Алехина С., Щербатюк Т. Озонотерапия: клинические и экспериментальные аспекты // Н. Новгород: Литера. – 2003. – Т. 240. – С. 240.

235. Winterbourn C. C., Hampton M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling // Free Radical Biology and Medicine. -2008. - T. 45, No 5. -C. 549-561.

236. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Drosophila and the molecular genetics of pattern formation: Genesis of the body plan // Molecular Biology of the Cell. 4th editionGarland Science, 2002.

237. Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию //. – 2005.

238. Kostić D. A., Dimitrijević D. S., Stojanović G. S., Palić I. R., Đorđević A. S., Ickovski J. D. Xanthine oxidase: isolation, assays of activity, and inhibition // Journal of Chemistry. – 2015. – T. 2015.

239. Makino N., Sasaki K., Hashida K., Sakakura Y. A metabolic model describing the H2O2 elimination by mammalian cells including H2O2 permeation through cytoplasmic and peroxisomal membranes: comparison with experimental data // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 2004. – T. 1673,  $N_{2}$  3. – C. 149-159.

240. Antunes F., Cadenas E. Estimation of H2O2 gradients across biomembranes // FEBS letters. – 2000. – T. 475, № 2. – C. 121-126.

241. Seaver L. C., Imlay J. A. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in Escherichia coli // Journal of bacteriology. – 2001.
– T. 183, № 24. – C. 7173-7181.

242. Sousa-Lopes A., Antunes F., Cyrne L., Marinho H. Decreased cellular permeability to H2O2 protects Saccharomyces cerevisiae cells in stationary phase against oxidative stress // FEBS letters. – 2004. – T. 578,  $N_{\rm P}$  1-2. – C. 152-156.

243. Mathai J. C., Sitaramam V. Stretch sensitivity of transmembrane mobility of hydrogen peroxide through voids in the bilayer. Role of cardiolipin // Journal of Biological Chemistry. – 1994. – T. 269,  $N_{2}$  27. – C. 17784-17793.

244. Bertolotti M., Bestetti S., García-Manteiga J. M., Medrano-Fernandez I., Dal Mas A., Malosio M. L., Sitia R. Tyrosine kinase signal modulation: a matter of H2O2 membrane permeability? // Book Tyrosine kinase signal modulation: a matter of H2O2 membrane permeability? // EditorMary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 2013.

245. Bienert G. P., Møller A. L., Kristiansen K. A., Schulz A., Møller I. M., Schjoerring J. K., Jahn T. P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – T. 282, № 2. – C. 1183-1192.

246. Dalla Sega F. V., Zambonin L., Fiorentini D., Rizzo B., Caliceti C., Landi L., Hrelia S., Prata C. Specific aquaporins facilitate Nox-produced hydrogen peroxide transport through plasma membrane in leukaemia cells // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2014. – T. 1843, No 4. – C. 806-814.

247. Benetti F., Gomes-Filho J. E., Ferreira L. L., Ervolino E., Briso A. L. F., Sivieri-Araújo G., Dezan-Júnior E., Cintra L. T. A. Hydrogen peroxide induces cell proliferation and apoptosis in pulp of rats after dental bleaching *in vivo*: Effects of the dental bleaching in pulp // Archives of oral biology. -2017. - T. 81. - C. 103-109.

248. Hirobe T., Shibata T., Sato K. Human fibroblasts treated with hydrogen peroxide stimulate human melanoblast proliferation and melanocyte differentiation, but inhibit melanocyte proliferation in serum-free co-culture system // Journal of dermatological science. -2016. - T. 84, No 3. - C. 282-295.

249. Henle E. S., Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide // Journal of Biological Chemistry. – 1997. – T. 272,  $N_{2}$  31. – C. 19095-19098.

250. Mizutani H., Hayashi Y., Hashimoto M., Imai M., Ichimaru Y., Kitamura Y., Ikemura K., Miyazawa D., Ohta K., Ikeda Y. Oxidative DNA Damage and Apoptosis Induced by Aclarubicin, an Anthracycline: Role of Hydrogen Peroxide and Copper // Anticancer research. – 2019. – T. 39, N 7. – C. 3443-3451.

251. Pericone C. D., Bae D., Shchepetov M., McCool T., Weiser J. N. Short-sequence tandem and nontandem DNA repeats and endogenous hydrogen peroxide production contribute to genetic instability of Streptococcus pneumoniae // Journal of bacteriology. -2002. - T. 184, No 16. - C. 4392-4399.

252. Policastro L., Molinari B., Larcher F., Blanco P., Podhajcer O. L., Costa C. S., Rojas P., Durán H. Imbalance of antioxidant enzymes in tumor cells and inhibition of proliferation and malignant features by scavenging hydrogen peroxide // Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center. – 2004. – T. 39, № 2. – C. 103-113.

253. Wan C., Xiang J., Li Y., Guo D. Differential gene expression patterns in chicken cardiomyocytes during hydrogen peroxide-induced apoptosis // PLoS One. – 2016. – T. 11,  $N_{2}$  1. – C. e0147950.

254. Pervaiz S., Clement M.-V. Superoxide anion: oncogenic reactive oxygen species? // The international journal of biochemistry & cell biology. – 2007. – T. 39, № 7-8. – C. 1297-1304.

255. Ali M. A., Kandasamy A. D., Fan X., Schulz R. Hydrogen peroxide-induced necrotic cell death in cardiomyocytes is independent of matrix metalloproteinase-2 // Toxicology *in vitro*. -2013. - T. 27, No 6. -C. 1686-1692.

256. Baek S. M., Kwon C. H., Kim J. H., Woo J. S., Jung J. S., Kim Y. K. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells // Journal of Laboratory and Clinical Medicine. – 2003. – T. 142,  $N_{2}$  3. – C. 178-186.

257. Ruch W., Cooper P. H., Baggiolini M. Assay of H2O2 production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horse-radish peroxidase // Journal of immunological methods. -1983. - T. 63, No 3. - C. 347-357.

258. Wartenberg M., Diedershagen H., Hescheler J., Sauer H. Growth stimulation versus induction of cell quiescence by hydrogen peroxide in prostate tumor spheroids is encoded by the duration of the Ca2+ response // Journal of Biological Chemistry. – 1999. – T. 274, No 39. – C. 27759-27767.

259. Holmström K. M., Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling // Nature reviews Molecular cell biology. -2014. - T. 15,  $N_{\rm P} 6. - C. 411-421.$ 

260. Kahlos K., Soini Y., Sormunen R., Kaarteenaho-Wiik R., Pääkkö P., Linnainmaa K., Kinnula V. L. Expression and prognostic significance of catalase in malignant mesothelioma // Cancer. – 2001. – T. 91, № 7. – C. 1349-1357.

261. Vilema-Enríquez G., Arroyo A., Grijalva M., Amador-Zafra R. I., Camacho J. Molecular and cellular effects of hydrogen peroxide on human lung cancer cells:

potential therapeutic implications // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2016. – T. 2016.

262. McKeague A., Wilson D., Nelson J. Staurosporine-induced apoptosis and hydrogen peroxide-induced necrosis in two human breast cell lines // British journal of cancer. -2003. - T. 88, No 1. - C. 125-131.

263. Simizu S., Takada M., Umezawa K., Imoto M. Requirement of caspase-3 (-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs // Journal of Biological Chemistry. – 1998. – T. 273, № 41. – C. 26900-26907.

264. Fedoroff N. Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses // Annals of Botany. – 2006. – T. 98, № 2. – C. 289-300.

265. Rhee S. G., Kang S. W., Jeong W., Chang T.-S., Yang K.-S., Woo H. A. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins // Current opinion in cell biology. -2005. - T. 17, No 2. -C. 183-189.

266. Claiborne A., Yeh J. I., Mallett T. C., Luba J., Crane E. J., Charrier V., Parsonage D. Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation // Biochemistry. – 1999. – T. 38,  $N_{2}$  47. – C. 15407-15416.

267. Eaton P. Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures // Free Radical Biology and Medicine. -2006. - T. 40, No 11. - C. 1889-1899.

268. Sen C. K. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants // Biochemical pharmacology. -1998. - T. 55, No 11. - C. 1747-1758.

269. Woo H. A., Yim S. H., Shin D. H., Kang D., Yu D.-Y., Rhee S. G. Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H2O2 accumulation for cell signaling // cell. -2010. - T. 140, No 4. -C. 517-528.

270. Wood Z. A., Poole L. B., Karplus P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling // Science. – 2003. – T. 300, № 5619. – C. 650-653.

271. Cox A. G., Hampton M. B. Bcl-2 over-expression promotes genomic instability by inhibiting apoptosis of cells exposed to hydrogen peroxide // Carcinogenesis. -2007. -T. 28, No 10. - C. 2166-2171.

272. Low F. M., Hampton M. B., Peskin A. V., Winterbourn C. C. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte // Blood. -2007. - T. 109, No 6. - C. 2611-2617.

273. Bosch M., Serras F., Martín-Blanco E., Baguñà J. JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating Drosophila wing imaginal discs // Developmental biology. -2005. - T. 280, No 1. - C. 73-86.

274. Kanda H., Miura M. Regulatory roles of JNK in programmed cell death // Journal of biochemistry. -2004. - T. 136, No 1. - C. 1-6.

275. Sabapathy K., Hochedlinger K., Nam S. Y., Bauer A., Karin M., Wagner E. F. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation // Molecular cell. – 2004. – T. 15,  $N_{2}$  5. – C. 713-725.

276. Vlahopoulos S. A. Aberrant control of NF-κB in cancer permits transcriptional and phenotypic plasticity, to curtail dependence on host tissue: molecular mode // Cancer biology & medicine. -2017. - T. 14, No 3. - C. 254.

277. Nicholson D. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death // Cell Death & Differentiation. – 1999. – T. 6,  $N_{2}$  11. – C. 1028-1042.

278. Barbouti A., Amorgianiotis C., Kolettas E., Kanavaros P., Galaris D. Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner // Free Radical Biology and Medicine. – 2007. – T. 43, N 10. – C. 1377-1387.

279. Borutaite V., Brown G. C. Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide // FEBS letters. – 2001. – T. 500, № 3. – C. 114-118.

280. Price R., Van Vugt M., Nosten F., Luxemburger C., Brockman A., Phaipun L., Chongsuphajaisiddhi T., White N. Artesunate versus artemether for the treatment of recrudescent multidrug-resistant falciparum malaria // The American journal of tropical medicine and hygiene. – 1998. – T. 59, No 6. – C. 883-888.

281. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants // Experimental Physiology: Translation and Integration. – 1997. – T. 82, № 2. – C. 291-295.

282. Schafer F. Q., Buettner G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple // Free Radical Biology and Medicine. -2001. - T. 30, No 11. - C. 1191-1212.

283. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases // Annual review of biochemistry. -1995. - T. 64, No 1. - C. 97-112.

284. Hart P. J., Balbirnie M. M., Ogihara N. L., Nersissian A. M., Weiss M. S., Valentine J. S., Eisenberg D. A structure-based mechanism for copper– zinc superoxide dismutase // Biochemistry. – 1999. – T. 38,  $N_{2}$  7. – C. 2167-2178.

285. Tainer J. A., Getzoff E. D., Richardson J. S., Richardson D. C. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase // Nature. – 1983. – T. 306, № 5940. – C. 284-287.

286. Hassan H. M., Fridovich I. Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in Escherichia coli // Journal of bacteriology. – 1977. – T. 129, № 3. – C. 1574-1583.

287. Hassan H. M., Fridovich I. Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1979. – T. 196, No 2. – C. 385-395.

288. Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs // Physiological reviews. – 1979. – T. 59, № 3. – C. 527-605.

289. Chelikani P., Fita I., Loewen P. C. Diversity of structures and properties among catalases // Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. – 2004. – T. 61, № 2. – C. 192-208.

290. Bendayan M., Reddy J. Immunocytochemical localization of catalase and heatlabile enoyl-CoA hydratase in the livers of normal and peroxisome proliferator-treated rats // Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. -1982. -T. 47, No 4. - C. 364-369.

291. Hashimoto F., Hayashi H. Significance of catalase in peroxisomal fatty acyl-CoA  $\beta$ -oxidation: NADH oxidation by acetoacetyl-CoA and H2O2 // The Journal of Biochemistry. – 1990. – T. 108, No 3. – C. 426-431.

292. Litwin J., Völkl A., Müller-Höcker J., Hashimoto T., Fahimi H. Immunocytochemical localization of peroxisomal enzymes in human liver biopsies // The American journal of pathology. – 1987. – T. 128,  $\mathbb{N}$  1. – C. 141.

293. Hofmann B., Hecht H.-J., Flohé L. Peroxiredoxins // Biological chemistry. – 2002.
- T. 383, № 3-4. – C. 347-364.

294. Rhee S. G., Kang S. W., Netto L. E., Seo M. S., Stadtman E. R. A family of novel peroxidases, peroxiredoxins // Biofactors. – 1999. – T. 10, № 2-3. – C. 207-209.

295. Neumann C. A., Krause D. S., Carman C. V., Das S., Dubey D. P., Abraham J. L., Bronson R. T., Fujiwara Y., Orkin S. H., Van Etten R. A. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression // Nature. -2003. - T. 424, No 6948. - C. 561-565.

296. Flohe L., Gunzler W., Schock H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme // FEBS lett. – 1973. – T. 32, № 1. – C. 132-134.

297. Holmgren A. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide // Structure. -1995. - T. 3, No 3. - C. 239-243.

298. Кулинский В. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – Т. 1, № 38. – С. 2.

299. Beutler E. Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: *in vivo* and *in vitro* studies // The Journal of clinical investigation. -1969. - T. 48,  $N \ge 10. - C.$  1957-1966.

300. Carlberg I., Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver // Journal of Biological Chemistry. – 1975. – T. 250,  $N_{2}$  14. – C. 5475-5480.

301. Sharma R., Yang Y., Sharma A., Awasthi S., Awasthi Y. C. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis // Antioxidants and Redox Signaling. – 2004. – T. 6, N 2. – C. 289-300.

302. Townsend D. M., Tew K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance // Oncogene. – 2003. – T. 22, № 47. – C. 7369-7375.

303. Gañán-Gómez I., Wei Y., Yang H., Boyano-Adánez M. C., García-Manero G. Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2 // Free Radical Biology and Medicine. – 2013. – T. 65. – C. 750-764.

304. Gold R., Kappos L., Arnold D. L., Bar-Or A., Giovannoni G., Selmaj K., Tornatore C., Sweetser M. T., Yang M., Sheikh S. I. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis // New England Journal of Medicine. – 2012. – T. 367,  $N_{2}$  12. – C. 1098-1107.

305. Lau A., Villeneuve N. F., Sun Z., Wong P. K., Zhang D. D. Dual roles of Nrf2 in cancer // Pharmacological research. – 2008. – T. 58, № 5-6. – C. 262-270.

306. Haack M., Löwinger M., Lippmann D., Kipp A., Pagnotta E., Iori R., Monien B. H., Glatt H., Brauer M. N., Wessjohann L. A. Breakdown products of neoglucobrassicin inhibit activation of Nrf2 target genes mediated by myrosinase-derived glucoraphanin hydrolysis products // Biological chemistry. – 2010. – T. 391, № 11. – C. 1281-1293.

307. Franklin C. C., Backos D. S., Mohar I., White C. C., Forman H. J., Kavanagh T. J. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase // Molecular aspects of medicine. – 2009. – T. 30,  $N_{\rm D}$  1-2. – C. 86-98.

308. Solis W. A., Dalton T. P., Dieter M. Z., Freshwater S., Harrer J. M., He L., Shertzer H. G., Nebert D. W. Glutamate–cysteine ligase modifier subunit: mouse Gclm gene structure and regulation by agents that cause oxidative stress // Biochemical pharmacology. – 2002. – T. 63,  $N_{2}$  9. – C. 1739-1754.

309. Hayes J., Chanas S., Henderson C., McMahon M., Sun C., Moffat G., Wolf C., Yamamoto M. The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin // Biochemical Society Transactions. -2000. - T. 28, No 2. - C. 33-41.

310. Neumann C. A., Cao J., Manevich Y. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling // Cell cycle. – 2009. – T. 8, № 24. – C. 4072-4078. 311. Soriano F. X., Baxter P., Murray L. M., Sporn M. B., Gillingwater T. H., Hardingham G. E. Transcriptional regulation of the AP-1 and Nrf2 target gene sulfiredoxin // Molecules and cells. -2009. - T. 27, No 3. - C. 279-282.

312. Jönsson T. J., Lowther W. T. The peroxiredoxin repair proteins // Peroxiredoxin SystemsSpringer, 2007. – C. 115-141.

313. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems // Journal of Biological Chemistry. – 1989. – T. 264, № 24. – C. 13963-13966.

314. Nordberg J., Arnér E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system // Free Radical Biology and Medicine. -2001. - T. 31, No 11. -C. 1287-1312.

315. Venugopal R., Jaiswal A. K. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD (P) H: quinone oxidoreductase1 gene // Proceedings of the National Academy of Sciences. -1996. - T. 93, No 25. - C. 14960-14965.

316. Kohar I., Baca M., Suarna C., Stocker R., Southwell-Keely P. T. Is α-tocopherol a reservoir for α-tocopheryl hydroquinone? // Free Radical Biology and Medicine. – 1995.
– T. 19, № 2. – C. 197-207.

317. Bartosz G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species // Clinica Chimica Acta. – 2006. – T. 368, № 1-2. – C. 53-76.

318. Knecht K. T., Mason R. *In vivo* spin trapping of xenobiotic free radical metabolites // Archives of biochemistry and biophysics (Print). – 1993. – T. 303, No 2. – C. 185-194. 319. Tuccio B., Lauricella R., Fréjaville C., Bouteiller J.-C., Tordo P. Decay of the hydroperoxyl spin adduct of 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: an EPR kinetic study // Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2. – 1995. No 2. – C. 295-298.

320. Roubaud V., Sankarapandi S., Kuppusamy P., Tordo P., Zweier J. L. Quantitative measurement of superoxide generation and oxygen consumption from leukocytes using electron paramagnetic resonance spectroscopy // Analytical biochemistry. – 1998. – T. 257, No 2. – C. 210-217.

321. Stolze K., Rohr-Udilova N., Rosenau T., Stadtmüller R., Nohl H. Very stable superoxide radical adducts of 5-ethoxycarbonyl-3, 5-dimethyl-pyrroline N-oxide (3, 5-EDPO) and its derivatives // Biochemical pharmacology. – 2005. – T. 69, No 9. – C. 1351-1361.

322. Michail K., Siraki A. G. Post-trapping derivatization of radical-derived EPR-silent adducts: application to free radical detection by HPLC/UV in chemical, biochemical, and biological systems and comparison with EPR spectroscopy // Analytical chemistry. -2012. - T. 84, No 15. - C. 6739-6746.

323. Sousa E. H. S., de Mesquita Vieira F. G., Butler J. S., Basso L. A., Santiago D. S., Diógenes I. C. N., de França Lopes L. G., Sadler P. J. [Fe(CN)5(isoniazid)]3- : an Iron Isoniazid Complex with Redox Behavior Implicated in Tuberculosis Therapy // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2014. – T. 140. – C. 236-244.

324. Mills A., Skinner G. A. A novel 'fizziness' indicator // Analyst. – 2011. – T. 136, № 5. – C. 894-896.

325. Pick E., Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture // Journal of immunological methods. -1980. - T. 38, No 1-2. -C. 161-170.

326. Schopf R., Mattar J., Meyenburg W., Scheiner O., Hammann K., Lemmel E.-M. Measurement of the respiratory burst in human monocytes and polymorphonuclear leukocytes by nitro blue tetrazolium reduction and chemiluminescence // Journal of immunological methods. – 1984. – T. 67,  $N_{\rm P}$  1. – C. 109-117.

327. Sim Choi H., Woo Kim J., Cha Y. N., Kim C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells // Journal of Immunoassay and Immunochemistry. -2006. - T. 27, No 1. -C. 31-44.

328. Bernas T., Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes // Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology. – 2002. – T. 47,  $N_{2}$  4. – C. 236-242.

329. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay // J. Immunol. Methods. -1983. -T. 65. -C. 55-63.

330. Rest R. F. Measurement of human neutrophil respiratory burst activity during phagocytosis of bacteria // Methods in enzymologyElsevier, 1994. – C. 119-136.

331. Boveris A., Alvarez S., Bustamante J., Valdez L. Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles // Methods in enzymologyElsevier, 2002. - C. 280-287.

332. Sanders S. P., Harrison S. J., Kuppusamy P., Sylvester J. T., Zweier J. L. A comparative study of EPR spin trapping and cytochrome c reduction techniques for the measurement of superoxide anions // Free Radical Biology and Medicine. – 1994. – T. 16,  $N_{2}$  6. – C. 753-761.

333. Bellavitte P., Dri P., Della V., Bianca, , Serra M. The measurement of superoxide anion production by granulocytes in whole blood. A clinical test for the evaluation of phagocyte function and serum opsonic capacity // European journal of clinical investigation. – 1983. – T. 13,  $N_{2}$  4. – C. 363-368.

334. Björquist P., Palmer M., Ek B. Measurement of superoxide anion production using maximal rate of cytochrome (III) C reduction in phorbol ester stimulated neutrophils, immobilised to microtiter plates // Biochemical pharmacology. – 1994. – T. 48, № 10. – C. 1967-1972.

335. Rinaldi M., Moroni P., Paape M. J., Bannerman D. D. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species // Veterinary Immunology and Immunopathology. – 2007. – T. 115, № 1-2. – C. 107-125.

336. Khan P., Idrees D., Moxley M. A., Corbett J. A., Ahmad F., von Figura G., Sly W. S., Waheed A., Hassan M. I. Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses // Applied biochemistry and biotechnology. – 2014. – T. 173, No 2. – C. 333-355.

337. Roshchupkin D., Belakina N., Murina M. Luminol-enhanced chemiluminescence of rabbit polymorphonuclear leukocytes: The nature of oxidants that directly cause luminol oxidation // Biophysics. – 2006. – T. 51,  $N_{2}$  1. – C. 79-86.

338. Bedouhène S., Moulti-Mati F., Hurtado-Nedelec M., Dang P. M.-C., El-Benna J. Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils // American journal of blood research. -2017. - T. 7, No 4. -C. 41.

339. Fûrész J., Csikor K., Németh K., Schweitzer K., Lakatos S. Luminol-dependent chemiluminescence is related to the extracellularly released reactive oxygen intermediates in the case of rat neutrophils activated by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine // Haematologia. -2001. - T. 31, No 4. -C. 277-285.

340. Yıldız G., Demiryürek A. T. Ferrous iron-induced luminol chemiluminescence: a method for hydroxyl radical study // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. – 1998. – T. 39, № 3. – C. 179-184.

341. Castro L., Alvarez M. a. N., Radi R. Modulatory role of nitric oxide on superoxidedependent luminol chemiluminescence // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1996. – T. 333, № 1. – C. 179-188.

342. Kooy N. W., Royall J. A. Agonist-induced peroxynitrite production from endothelial cells // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1994. – T. 310, № 2. – C. 352-359.

343. Dahlgren C., Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils // Journal of immunological methods. – 1999. – T. 232, № 1-2. – C. 3-14.

344. Ginsburg I., Misgav R., Gibbs D. F., Varani J., Kohen R. Chemiluminescence in activated human neutrophils // Inflammation. – 1993. – T. 17, № 3. – C. 227-243.

345. Jancinová V., Drábiková K., Nosál R., Racková L., Májeková M., Holománová D. The combined luminol/isoluminol chemiluminescence method for differentiating between extracellular and intracellular oxidant production by neutrophils // Redox Report. – 2006. – T. 11,  $N_{2}$  3. – C. 110-116.

346. Lundqvist H., Dahlgren C. Isoluminol-enhanced chemiluminescence: a sensitive method to study the release of superoxide anion from human neutrophils // Free Radical Biology and Medicine. -1996. - T. 20, No 6. - C. 785-792.

347. Dikalov S., Griendling K. K., Harrison D. G. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies // Hypertension. – 2007. – T. 49, No 4. – C. 717-727.

348. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects // Free Radical Biology and Medicine. -2007. - T. 43, No 7. - C. 995-1022.

349. Caldefie-Chézet F., Walrand S., Moinard C., Tridon A., Chassagne J., Vasson M.-P. Is the neutrophil reactive oxygen species production measured by luminol and lucigenin chemiluminescence intra or extracellular? Comparison with DCFH-DA flow cytometry and cytochrome c reduction // Clinica Chimica Acta. – 2002. – T. 319, No 1. – C. 9-17.

350. Gyllenhammar H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production // Journal of immunological methods. – 1987. – T. 97, No 2. – C. 209-213.

351. Liochev S. I., Fridovich I. Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1997. – T. 337, No 1. – C. 115-120.

352. Müller-Peddinghaus R. *In vitro* determination of phagocyte activity by luminoland lucigenin-amplified chemiluminescence // International journal of immunopharmacology. -1984. - T. 6, No 5. -C. 455-466.

353. Myhre O., Andersen J. M., Aarnes H., Fonnum F. Evaluation of the probes 2', 7'dichlorofluorescin diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation // Biochemical pharmacology. -2003. - T. 65, No 10. -C. 1575-1582.

354. Kopprasch S., Pietzsch J., Graessler J. Validation of different chemilumigenic substrates for detecting extracellular generation of reactive oxygen species by phagocytes and endothelial cells // Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence. -2003. - T. 18, No 5. -C. 268-273.

355. Pavelkova M., Kubala L. Luminol-, isoluminol-and lucigenin-enhanced chemiluminescence of rat blood phagocytes stimulated with different activators // Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence. – 2004. – T. 19,  $N_{\rm P}$  1. – C. 37-42.

356. Halawa M. I., Saqib M., Gao W., Qi L., Zhang W., Xu G. Pyridoxal 5'-phosphate assay based on lucigenin chemiluminescence // Microchimica Acta. – 2018. – T. 185, № 8. – C. 381.

357. Drábiková K., Nosál' R., Jančinová V., Číž M., Lojek A. Reactive oxygen metabolite production is inhibited by histamine and H 1-antagonist dithiaden in human PMN leukocytes // Free radical research. – 2002. – T. 36, № 9. – C. 975-980.

358. Nishinaka Y., Aramaki Y., Yoshida H., Masuya H., Sugawara T., Ichimori Y. A new sensitive chemiluminescence probe, L-012, for measuring the production of superoxide anion by cells // Biochemical and biophysical research communications. – 1993. – T. 193, No 2. – C. 554-559.

359. Sohn H.-Y., Gloe T., Keller M., Schoenafinger K., Pohl U. Sensitive superoxide detection in vascular cells by the new chemiluminescence dye L-012 // Journal of vascular research. – 1999. – T. 36,  $N_{2}$  6. – C. 456-464.

360. Ambasta R. K., Schreiber J. G., Janiszewski M., Busse R., Brandes R. P. Noxa1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase in mice // Free Radical Biology and Medicine. -2006. - T. 41, No 2. -C. 193-201.

361. Daiber A., Oelze M., August M., Wendt M., Sydow K., Wieboldt H., Kleschyov A. L., Munzel T. Detection of superoxide and peroxynitrite in model systems and mitochondria by the luminol analogue L-012 // Free radical research. – 2004. – T. 38,  $N_{\odot}$  3. – C. 259-269.

362. Ichibangase T., Ohba Y., Kishikawa N., Nakashima K., Kuroda N. Evaluation of lophine derivatives as L-012 (luminol analog)-dependent chemiluminescence enhancers for measuring horseradish peroxidase and H2O2 // Luminescence. – 2014. – T. 29, No 2. – C. 118-121.

363. Judkins C. P., Diep H., Broughton B. R., Mast A. E., Hooker E. U., Miller A. A., Selemidis S., Dusting G. J., Sobey C. G., Drummond G. R. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE-/- mice // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2010. – T. 298,  $N_{\rm P}$  1. – C. H24-H32.

364. Imada I., Sato E. F., Miyamoto M., Ichimori Y., Minamiyama Y., Konaka R., Inoue M. Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012 // Analytical biochemistry. – 1999. – T. 271,  $N_{2}$  1. – C. 53-58.

365. Nakano M. Detection of active oxygen species in biological systems // Cellular and molecular neurobiology. -1998. - T. 18, No 6. -C. 565-579.

366. Nakata M., Itou T., Sakai T. Isolation and chemiluminescent properties of ferret (Mustela putorius furo) polymorphonuclear cells // Journal of Veterinary Medical Science. – 2007. – T. 69, № 12. – C. 1321-1324.

367. Rinaldi M., Moroni P., Paape M. J., Bannerman D. D. Differential alterations in the ability of bovine neutrophils to generate extracellular and intracellular reactive oxygen species during the periparturient period // The Veterinary Journal. – 2008. – T. 178,  $N_{2}$  2. – C. 208-213.

368. Saez F., Motta C., Boucher D., Grizard G. Prostasomes inhibit the NADPH oxidase activity of human neutrophils // MHR: Basic science of reproductive medicine. -2000. - T. 6, No 10. - C. 883-891.

369. Arisawa F., Tatsuzawa H., Kambayashi Y., Kuwano H., Fujimori K., Nakano M. MCLA-dependent chemiluminescence suggests that singlet oxygen plays a pivotal role in myeloperoxidase-catalysed bactericidal action in neutrophil phagosomes // Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence. -2003. - T. 18, No 4. -C. 229-238.

370. Bass D., Parce J. W., Dechatelet L. R., Szejda P., Seeds M., Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation // The Journal of Immunology. – 1983. – T. 130,  $N_{2}$  4. – C. 1910-1917.

371. Royall J. A., Ischiropoulos H. Evaluation of 2', 7'-dichlorofluorescin and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H2O2 in cultured endothelial cells // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1993. – T. 302, No 2. – C. 348-355.

372. Kooy N. W., Royall J. A., Ischlropoulos H. Oxidation of 2', 7'-dichlorofluorescin by peroxynitrite // Free radical research. – 1997. – T. 27, № 3. – C. 245-254.

373. LeBel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. Evaluation of the probe 2', 7'dichlorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress // Chemical research in toxicology. – 1992. – T. 5, No 2. – C. 227-231. 374. Qian S. Y., Buettner G. R. Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study // Free Radical Biology and Medicine. – 1999. – T. 26,  $N_{2}$  11-12. – C. 1447-1456.

375. Keston A. S., Brandt R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide // Analytical biochemistry. – 1965. – T. 11,  $N_{2}$  1. – C. 1-5.

376. Possel H., Noack H., Augustin W., Keilhoff G., Wolf G. 2, 7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation // FEBS letters. – 1997. – T. 416,  $N_{2}$  2. – C. 175-178.

377. Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies K. J., Dennery P. A., Forman H. J., Grisham M. B., Mann G. E., Moore K., Roberts II L. J., Ischiropoulos H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations // Free Radical Biology and Medicine. -2012. - T. 52, No 1. -C. 1-6.

378. Karlsson M., Kurz T., Brunk U. T., Nilsson S. E., Frennesson C. I. What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? // Biochemical Journal. – 2010. - T. 428, No 2. - C. 183-190.

379. Burow S., Valet G. Flow-cytometric characterization of stimulation, free radical formation, peroxidase activity and phagocytosis of human granulocytes with 2, 7-dichlorofluorescein (DCF) // Eur J Cell Biol. – 1987. – T. 43,  $N_{2}$  1. – C. 128-133.

380. Rothe G., Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2', 7'-dichlorofluorescin // Journal of leukocyte biology. – 1990. – T. 47, No 5. – C. 440-448.

381. Swift L. M., Sarvazyan N. Localization of dichlorofluorescin in cardiac myocytes: implications for assessment of oxidative stress // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. -2000. - T. 278,  $N \ge 3. - C.$  H982-H990.

382. Ubezio P., Civoli F. Flow cytometric detection of hydrogen peroxide production induced by doxorubicin in cancer cells // Free Radical Biology and Medicine. – 1994. – T. 16,  $N_{2}$  4. – C. 509-516.
383. Crow J. P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species // Nitric oxide. – 1997. – T. 1, No 2. – C. 145-157. 384. Vowells S., Sekhsaria S., Malech H., Shalit M., Fleisher T. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes // Journal of immunological methods. – 1995. – T. 178, No 1. – C. 89-97.

385. Freitas M., Lima J. L., Fernandes E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review // Analytica chimica acta.  $-2009. - T. 649, N_{\odot}$  1. -C. 8-23.

386. Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species // Journal of biochemical and biophysical methods. -2005. - T. 65, No 2-3. - C. 45-80.

387. Miwa S., Treumann A., Bell A., Vistoli G., Nelson G., Hay S., von Zglinicki T. Carboxylesterase converts Amplex red to resorufin: Implications for mitochondrial H2O2 release assays // Free Radical Biology and Medicine. – 2016. – T. 90. – C. 173-183.

388. Mohanty J., Jaffe J. S., Schulman E. S., Raible D. G. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H2O2 release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative // Journal of immunological methods. – 1997. – T. 202, No 2. – C. 133-141.

389. Zhou M., Diwu Z., Panchuk-Voloshina N., Haugland R. P. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases // Analytical biochemistry. – 1997. – T. 253, No 2. – C. 162-168.

390. Setsukinai K.-i., Urano Y., Kakinuma K., Majima H. J., Nagano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – T. 278,  $N_{2}$  5. – C. 3170-3175.

391. Sumitomo K., Shishido N., Aizawa H., Hasebe N., Kikuchi K., Nakamura M. Effects of MCI-186 upon neutrophil-derived active oxygens // Redox Report. – 2007. – T. 12, № 4. – C. 189-194.

392. De la Harpe J., Nathan C. F. A semi-automated micro-assay for H2O2 release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages // Journal of immunological methods. – 1985. – T. 78,  $N_{2}$  2. – C. 323-336.

393. Tsan M., Douglass K., McIntyre P. Hydrogen peroxide production and killing of Staphylococcus aureus by human polymorphonuclear leukocytes //. – 1977.

394. Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea // Journal of cellular and comparative physiology. – 1962. – T. 59, No 3. – C. 223-239.

395. Palazzolo A. M., Suquet C., Konkel M. E., Hurst J. K. Green fluorescent proteinexpressing Escherichia coli as a selective probe for HOCl generation within neutrophils // Biochemistry. -2005. - T. 44, No 18. - C. 6910-6919.

396. Zheng M., Åslund F., Storz G. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation // Science. – 1998. – T. 279, № 5357. – C. 1718-1722.

397. Belousov V. V., Fradkov A. F., Lukyanov K. A., Staroverov D. B., Shakhbazov K. S., Terskikh A. V., Lukyanov S. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide // Nature methods. -2006. - T. 3, No 4. - C. 281-286.

398. Bilan D. S., Belousov V. V. HyPer family probes: state of the art // Antioxidants & redox signaling. – 2016. – T. 24, № 13. – C. 731-751.

399. Delaunay A., Pflieger D., Barrault M.-B., Vinh J., Toledano M. B. A thiol peroxidase is an H2O2 receptor and redox-transducer in gene activation // cell. – 2002. – T. 111,  $N_{2}$  4. – C. 471-481.

400. Markvicheva K. N., Bilan D. S., Mishina N. M., Gorokhovatsky A. Y., Vinokurov L. M., Lukyanov S., Belousov V. V. A genetically encoded sensor for H2O2 with expanded dynamic range // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2011. – T. 19,  $N_2$  3. – C. 1079-1084.

401. Bilan D. S., Pase L., Joosen L., Gorokhovatsky A. Y., Ermakova Y. G., Gadella T. W., Grabher C., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V. V. HyPer-3: a genetically encoded H2O2 probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging // ACS chemical biology. – 2013. – T. 8, No 3. – C. 535-542.

402. Ermakova Y. G., Bilan D. S., Matlashov M. E., Mishina N. M., Markvicheva K. N., Subach O. M., Subach F. V., Bogeski I., Hoth M., Enikolopov G. Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide // Nature communications. – 2014. – T. 5,  $N_{\rm P}$  1. – C. 1-9.

403. Poburko D., Santo-Domingo J., Demaurex N. Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations // Journal of Biological Chemistry. -2011. - T. 286, No 13. - C. 11672-11684.

404. Mishina N. M., Tyurin-Kuzmin P. A., Markvicheva K. N., Vorotnikov A. V., Tkachuk V. A., Laketa V., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V. V. Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? // Book Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? // EditorMary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 2011.

405. Belova A. S., Orlova A. G., Balalaeva I. V., Antonova N. O., Maslennikova A. V., Mishina N. M., Zagaynova E. V. Hydrogen peroxide detection in viable and apoptotic tumor cells under action of cisplatin and bleomycin // Photonics & Lasers in Medicine. -2016. - T. 5, No 2. - C. 113-121.

406. Kaminskyy V. O., Piskunova T., Zborovskaya I. B., Tchevkina E. M., Zhivotovsky B. Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and-independent apoptosis by stimulating ROS formation // Autophagy. – 2012. – T. 8, N 7. – C. 1032-1044.

407. Nerush A., Shchukina K., Orlova A. The Protective Role of N, N'-Dimethylthiourea and Its Effect on Hydrogen Peroxide Level of Hela Kyoto Cells under Cisplatin Action // Современные технологии в медицине. – 2018. – Т. 10, № 3 (eng). 408. Nerush A., Shchukina K., Balalaeva I., Orlova A. Hydrogen peroxide in the reactions of cancer cells to cisplatin // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 2019. – Т. 1863, № 4. – С. 692-702. 409. Peskova N. N., Brilkina A. A., Gorokhova A. A., Shilyagina N. Y., Kutova O. M., Nerush A. S., Orlova A. G., Klapshina L. G., Vodeneev V. V., Balalaeva I. V. The localization of the photosensitizer determines the dynamics of the secondary production of hydrogen peroxide in cell cytoplasm and mitochondria // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. -2021. - T. 219. - C. 112208.

410. Brilkina A. A., Peskova N. N., Dudenkova V. V., Gorokhova A. A., Sokolova E. A., Balalaeva I. V. Monitoring of hydrogen peroxide production under photodynamic treatment using protein sensor HyPer // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2018. – T. 178. – C. 296-301.

411. Lyublinskaya O., Antonov S., Gorokhovtsev S., Pugovkina N., Kornienko J. S., Ivanova J. S., Shatrova A., Aksenov N., Zenin V., Nikolsky N. Flow cytometric HyPerbased assay for hydrogen peroxide // Free Radical Biology and Medicine. – 2018. – T. 128. – C. 40-49.

412. Конторщикова К., Белова А., Дуденкова В., Орлова А., Терентьев И., Цыбусов С., Алясова А. Уровень пероксида водорода в клетках линии HeLa в озонированной среде // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2017. № 2. – С. 123-127.

413. Laporte A., Lortz S., Schaal C., Lenzen S., Elsner M. Hydrogen peroxide permeability of cellular membranes in insulin-producing cells // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2020. – T. 1862, № 2. – C. 183096.

414. Huang K., Caplan J., Sweigard J. A., Czymmek K. J., Donofrio N. M. Optimization of the HyPer sensor for robust real-time detection of hydrogen peroxide in the rice blast fungus // Molecular plant pathology. -2017. - T. 18, No 2. -C. 298-307.

415. Pak V. V., Ezeriņa D., Lyublinskaya O. G., Pedre B., Tyurin-Kuzmin P. A., Mishina N. M., Thauvin M., Young D., Wahni K., Gache S. A. M. Ultrasensitive genetically encoded indicator for hydrogen peroxide identifies roles for the oxidant in cell migration and mitochondrial function // Cell metabolism. – 2020. – T. 31,  $N_{2}$  3. – C. 642-653. e6.

416. Rosenberg B. Fundamental studies with cisplatin // Cancer. – 1985. – T. 55, № 10. – C. 2303-2316.

417. Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode // Nature. – 1965. – T. 205, № 4972. – C. 698-699.

418. Todd R. C., Lippard S. J. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds // Metallomics. – 2009. – T. 1, № 4. – C. 280-291.

419. Eastman A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system // Cancer cells (Cold Spring Harbor, NY: 1989). – 1990. – T. 2, № 8-9. – C. 275-280.

420. Sherman S. E., Gibson D., Wang A., Lippard S. J. X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: cis-[Pt (NH3) 2 (d (pGpG))] // Science. – 1985. – T. 230, № 4724. – C. 412-417.

421. Andrews P. A., Mann S. C., Huynh H. H., Albright K. D. Role of the Na+, K+adenosine triphosphatase in the accumulation of cis-diamminedichloroplatinum (II) in human ovarian carcinoma cells // Cancer research. – 1991. – T. 51, No 14. – C. 3677-3681.

422. Ishida S., Lee J., Thiele D. J., Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – T. 99, No 22. – C. 14298-14302.

423. Safaei R., Howell S. B. Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs // Critical reviews in oncology/hematology. – 2005. – T. 53,  $N_{2}$  1. – C. 13-23.

424. Hall M. D., Okabe M., Shen D.-W., Liang X.-J., Gottesman M. M. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. -2008. - T. 48. - C. 495-535.

425. Zorbas H., Keppler B. K. Cisplatin damage: are DNA repair proteins saviors or traitors to the cell? // Chembiochem. – 2005. – T. 6, № 7. – C. 1157-1166.

426. Holzer A. K., Manorek G. H., Howell S. B. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin // Molecular pharmacology. – 2006. – T. 70,  $N_{\rm P}$  4. – C. 1390-1394.

427. Katano K., Kondo A., Safaei R., Holzer A., Samimi G., Mishima M., Kuo Y.-M., Rochdi M., Howell S. B. Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper // Cancer research. – 2002. – T. 62,  $N_{22}$  22. – C. 6559-6565.

428. Kawai K., Kamatani N., Georges E., Ling V. Identification of a membrane glycoprotein overexpressed in murine lymphoma sublines resistant to cisdiamminedichloroplatinum (II) // Journal of Biological Chemistry. – 1990. – T. 265, No 22. – C. 13137-13142.

429. Nakayama K., Miyazaki K., Kanzaki A., Fukumoto M., Takebayashi Y. Expression and cisplatin sensitivity of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinoma cell lines // Oncology reports. – 2001. – T. 8,  $N_{0}$  6. – C. 1285-1287.

430. Komatsu M., Sumizawa T., Mutoh M., Chen Z.-S., Terada K., Furukawa T., Yang X.-L., Gao H., Miura N., Sugiyama T. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance // Cancer research. – 2000. – T. 60, N 5. – C. 1312-1316.

431. Rabik C. A., Maryon E. B., Kasza K., Shafer J. T., Bartnik C. M., Dolan M. E. Role of copper transporters in resistance to platinating agents // Cancer chemotherapy and pharmacology. -2009. - T. 64, No 1. -C. 133-142.

432. Samimi G., Safaei R., Katano K., Holzer A. K., Rochdi M., Tomioka M., Goodman M., Howell S. B. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells // Clinical cancer research. – 2004. – T. 10,  $N_{\rm P}$  14. – C. 4661-4669.

433. Ishikawa T., Ali-Osman F. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum (II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance // Journal of Biological Chemistry. – 1993. – T. 268, No 27. – C. 20116-20125.

434. Godwin A. K., Meister A., O'Dwyer P. J., Huang C. S., Hamilton T. C., Anderson M. E. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with

marked increase of glutathione synthesis // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1992. – T. 89, № 7. – C. 3070-3074.

435. Boubakari, Bracht K., Neumann C., Grünert R., Bednarski P. J. No correlation between GSH levels in human cancer cell lines and the cell growth inhibitory activities of platinum diamine complexes // Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry. -2004. - T. 337,  $N_{2} 12. - C. 668-671$ .

436. Kasherman Y., Sturup S., Gibson D. Is glutathione the major cellular target of cisplatin? A study of the interactions of cisplatin with cancer cell extracts // Journal of medicinal chemistry. -2009. - T. 52, No 14. - C. 4319-4328.

437. Munchausen L. L., Rahn R. O. Physical studies on the binding of cisdichlorodiamine platinum (II) to DNA and homopolynucleotides // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis. – 1975. – T. 414,  $N_{2}$  3. – C. 242-255.

438. Ahmad S. Platinum–DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes // Chemistry & biodiversity. – 2010. – T. 7, No 3. – C. 543-566.

439. Fuertes M. A., Alonso C., Pérez J. M. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance // Chemical reviews. -2003. - T. 103, No 3. - C. 645-662.

440. Gomez-Ruiz S., Maksimović-Ivanić D., Mijatović S., Kaluđerović G. N. On the discovery, biological effects, and use of cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy // Bioinorganic chemistry and applications. – 2012. – T. 2012.

441. Attardi L. D., de Vries A., Jacks T. Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer // Oncogene. -2004. - T. 23, No 4. - C. 973-980.

442. Conklin K. A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness // Integrative cancer therapies. -2004. - T. 3, No 4. -C. 294-300.

443. Dasika G. K., Lin S.-C. J., Zhao S., Sung P., Tomkinson A., Lee E. Y. P. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis // Oncogene. – 1999. – T. 18, № 55. – C. 7883-7899.

444. Desoize B., Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment // Critical reviews in oncology/hematology. – 2002. – T. 42, № 3. – C. 317-325.

445. Velma V., Dasari S. R., Tchounwou P. B. Low doses of cisplatin induce gene alterations, cell cycle arrest, and apoptosis in human promyelocytic leukemia cells // Biomarker insights. – 2016. – T. 11. – C. BMI. S39445.

446. Sorenson C. M., Eastman A. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum (II)induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks // Cancer research. – 1988. – T. 48,  $N_{2}$  16. – C. 4484-4488.

447. Zamble D. B., Mu D., Reardon J. T., Sancar A., Lippard S. J. Repair of cisplatin– DNA adducts by the mammalian excision nuclease // Biochemistry. – 1996. – T. 35, № 31. – C. 10004-10013.

448. Ferry K. V., Hamilton T. C., Johnson S. W. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of  $\operatorname{ercc1-xpf}$  // Biochemical pharmacology.  $-2000. - T. 60, N_{2} 9. - C. 1305-1313.$ 

449. Fink D., Zheng H., Nebel S., Norris P. S., Aebi S., Lin T.-P., Nehmé A., Christen R. D., Haas M., MacLeod C. L. *In vitro* and *in vivo* resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair // Cancer research. – 1997. – T. 57, № 10. – C. 1841-1845.

450. Johnson S. W., Perez R. P., Godwin A. K., Yeung A. T., Handel L. M., Ozols R. F., Hamilton T. C. Role of platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines // Biochemical pharmacology. – 1994. – T. 47,  $N_{2}$  4. – C. 689-697.

451. Daino H., Matsumura I., Takada K., Odajima J., Tanaka H., Ueda S., Shibayama H., Ikeda H., Hibi M., Machii T. Induction of apoptosis by extracellular ubiquitin in human hematopoietic cells: possible involvement of STAT3 degradation by proteasome

pathway in interleukin 6-dependent hematopoietic cells // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2000. – T. 95, № 8. – C. 2577-2585.

452. Nguewa P. A., Fuertes M. A., Cepeda V., Iborra S., Carrión J., Valladares B., Alonso C., Pérez J. M. Pentamidine is an antiparasitic and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin // Chemistry & biodiversity. -2005. - T. 2,  $N_{2} 10. - C.$  1387-1400.

453. Söti C., Rácz A., Csermely P. A nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-Terminal domain of Hsp90 N-terminal nucleotide binding unmasks a C-Terminal binding pocket // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – T. 277, № 9. – C. 7066-7075.

454. Arnesano F., Natile G. "Platinum on the road": Interactions of antitumoral cisplatin with proteins // Pure and Applied Chemistry. -2008. - T. 80, No 12. -C. 2715-2725.

455. Wang D., Lippard S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs // Nature reviews Drug discovery. – 2005. – T. 4, № 4. – C. 307-320.

456. Machuy N., Rajalingam K., Rudel T. Requirement of caspase-mediated cleavage of c-Abl during stress-induced apoptosis // Cell Death & Differentiation. -2004. - T.11, No 3. -C. 290-300.

457. Peleg-Shulman T., Gibson D. Cisplatin– protein adducts are efficiently removed by glutathione but not by 5 '-guanosine monophosphate // Journal of the American Chemical Society. – 2001. – T. 123, № 13. – C. 3171-3172.

458. Basu S., Ma R., Boyle P. J., Mikulla B., Bradley M., Smith B., Basu M., Banerjee S. Apoptosis of human carcinoma cells in the presence of potential anti-cancer drugs: III. Treatment of Colo-205 and SKBR3 cells with: cis-platin, Tamoxifen, Melphalan, Betulinic acid, L-PDMP, L-PPMP, and GD3 ganglioside // Glycoconjugate journal. – 2003. – T. 20,  $N_{2}$  9. – C. 563-577.

459. Nithianandarajah-Jones G. N., Wilm B., Goldring C. E., Müller J., Cross M. J. ERK5: structure, regulation and function // Cellular signalling. – 2012. – T. 24, № 11. – C. 2187-2196.

460. Wang X., Martindale J. L., Holbrook N. J. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – T. 275, № 50. – C. 39435-39443.

461. DeHaan R. D., Yazlovitskaya E. M., Persons D. L. Regulation of p53 target gene expression by cisplatin-induced extracellular signal-regulated kinase // Cancer chemotherapy and pharmacology. -2001. - T. 48, No 5. -C. 383-388.

462. Mandic A., Viktorsson K., Heiden T., Hansson J., Shoshan M. The MEK1 inhibitor PD98059 sensitizes C8161 melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis // Melanoma research. -2001. - T. 11, No 1. - C. 11-19.

463. Hayakawa J., Ohmichi M., Kurachi H., Kanda Y., Hisamoto K., Nishio Y., Adachi K., Tasaka K., Kanzaki T., Murata Y. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin // Cancer research. – 2000. – T. 60, No 21. – C. 5988-5994.

464. Persons D. L., Yazlovitskaya E. M., Pelling J. C. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin // Journal of Biological Chemistry. -2000. - T. 275, No 46. - C. 35778-35785.

465. Yeh P. Y., Yeh K.-H., Chuang S.-E., Song Y. C., Cheng A.-L. Suppression of MEK/ERK signaling pathway enhances cisplatin-induced NF-κB activation by protein phosphatase 4-mediated NF-κB p65 Thr dephosphorylation // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – T. 279, № 25. – C. 26143-26148.

466. Zhang Y., Qu X., Jing W., Hu X., Yang X., Hou K., Teng Y., Zhang J., Liu Y. GSTP1 determines cis-platinum cytotoxicity in gastric adenocarcinoma MGC803 cells: regulation by promoter methylation and extracellular regulated kinase signaling // Anti-cancer drugs. -2009. - T. 20, No 3. - C. 208-214.

467. Mansouri A., Ridgway L. D., Korapati A. L., Zhang Q., Tian L., Wang Y., Siddik Z. H., Mills G. B., Claret F. X. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells // Journal of Biological Chemistry. -2003. - T. 278, No 21. -C. 19245-19256.

468. Sánchez-Perez I., Murguía J. R., Perona R. Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death // Oncogene. -1998. - T. 16, No 4. - C. 533-540.

469. Davis R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases // Inflammatory Processes:Springer, 2000. – C. 13-21.

470. Hayakawa J., Ohmichi M., Kurachi H., Ikegami H., Kimura A., Matsuoka T., Jikihara H., Mercola D., Murata Y. Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase or c-Jun N-terminal protein kinase cascade, differentially activated by cisplatin, sensitizes human ovarian cancer cell line // Journal of Biological Chemistry. – 1999. – T. 274, N 44. – C. 31648-31654.

471. Zanke B. W., Boudreau K., Rubie E., Winnett E., Tibbles L. A., Zon L., Kyriakis J., Liu F.-F., Woodgett J. R. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat // Current biology. – 1996. – T. 6,  $N_{2}$  5. – C. 606-613.

472. Wang D., Lippard S. J. Cisplatin-induced post-translational modification of histones H3 and H4 // Journal of Biological Chemistry. -2004. - T. 279, No 20. - C. 20622-20625.

473. Yuan Z.-q., Feldman R. I., Sussman G. E., Coppola D., Nicosia S. V., Cheng J. Q. Akt2 Inhibition of Cisplatin-induced JNK/p38 and Bax Activation by Phosphorylation of ASK1 Implication of AKT2 in Chemoresistance // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – T. 278,  $N_{2}$  26. – C. 23432-23440.

474. Weir N. M., Selvendiran K., Kutala V. K., Tong L., Vishwanath S., Rajaram M., Tridandapani S., Anant S., Kuppusamy P. Curcumin induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by modulating Akt and p38 MAPK // Cancer biology & therapy. – 2007. – T. 6, N 2. – C. 178-184.

475. Losa J. H., Cobo C. P., Viniegra J. G., Lobo V. J. S.-A., y Cajal S. R., Sanchez-Prieto R. Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy // Oncogene. – 2003. – T. 22, № 26. – C. 3998-4006.

476. Brazil D. P., Hemmings B. A. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow // Trends in biochemical sciences. – 2001. – T. 26, № 11. – C. 657-664.

477. Asselin E., Mills G. B., Tsang B. K. XIAP regulates Akt activity and caspase-3dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells // Cancer research. -2001. - T. 61, No 5. -C. 1862-1868.

478. Ohta T., Ohmichi M., Hayasaka T., Mabuchi S., Saitoh M., Kawagoe J., Takahashi K., Igarashi H., Du B., Doshida M. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase increases efficacy of cisplatin *in vivo* ovarian cancer models // Endocrinology. – 2006. – T. 147,  $N_{2}$  4. – C. 1761-1769.

479. Gagnon V., Van Themsche C., Turner S., Leblanc V., Asselin E. Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol // Apoptosis. -2008. - T. 13, No 2. - C. 259-271.

480. Gagnon V., Mathieu I., Sexton É., Leblanc K., Asselin E. AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells // Gynecologic oncology. – 2004. – T. 94, № 3. – C. 785-795.

481. Kamarajan P., Sun N.-K., CHAO C. C.-K. Up-regulation of FLIP in cisplatinselected HeLa cells causes cross-resistance to CD95/Fas death signalling // Biochemical Journal. – 2003. – T. 376, № 1. – C. 253-260.

482. Fulda S., Los M., Friesen C., Debatin K. M. Chemosensitivity of solid tumor cells *in vitro* is related to activation of the CD95 system // International journal of cancer. – 1998. – T. 76,  $N_{2}$  1. – C. 105-114.

483. Henkels K. M., Turchi J. J. Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3dependent and-independent pathways in cisplatin-resistant and-sensitive human ovarian cancer cell lines // Cancer research. – 1999. – T. 59, No 13. – C. 3077-3083.

484. Kojima H., Endo K., Moriyama H., Tanaka Y., Alnemri E. S., Slapak C. A., Teicher B., Kufe D., Datta R. Abrogation of mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in acquired multidrug resistance // Journal of Biological Chemistry. – 1998. – T. 273, № 27. – C. 16647-16650.

485. Seki K., Yoshikawa H., Shiiki K., Hamada Y., Akamatsu N., Tasaka K. Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8,-3 and-6 in osteosarcoma // Cancer chemotherapy and pharmacology. – 2000. – T. 45,  $N_{2}$  3. – C. 199-206.

486. Dehne N., Lautermann J., Petrat F., Rauen U., De Groot H. Cisplatin ototoxicity: involvement of iron and enhanced formation of superoxide anion radicals // Toxicology and applied pharmacology. -2001. - T. 174,  $N_{2} 1. - C. 27-34$ .

487. Jiang Y., Guo C., Vasko M. R., Kelley M. R. Implications of Ape1 in reactive oxygen signaling response following cisplatin treatment of dorsal root ganglion neurons // Cancer research. – 2008. – T. 68, № 15. – C. 6425.

488. Santos N., Catao C., Martins N., Curti C., Bianchi M., Santos A. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria // Archives of toxicology. -2007. - T. 81, No 7. - C. 495-504.

489. Kirshner J. R., He S., Balasubramanyam V., Kepros J., Yang C.-Y., Zhang M., Du Z., Barsoum J., Bertin J. Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress // Molecular cancer therapeutics. -2008. - T. 7, No 8. - C. 2319-2327.

490. McLean L., Soto U., Agama K., Francis J., Jimenez R., Pommier Y., Sowers L., Brantley E. Aminoflavone induces oxidative DNA damage and reactive oxidative species-mediated apoptosis in breast cancer cells // International journal of cancer. – 2008. – T. 122, No 7. – C. 1665-1674.

491. Zuliani T., Denis V., Noblesse E., Schnebert S., Andre P., Dumas M., Ratinaud M.-H. Hydrogen peroxide-induced cell death in normal human keratinocytes is differentiation dependent // Free Radical Biology and Medicine. -2005. - T. 38,  $N_{2} 3. - C. 307-316$ .

492. Fokstuen T., Rabo Y., Zhou J., Karlson J., Platz A., Shoshan M., Hansson J., Linder S. The Ras farnesylation inhibitor BZA-5B increases the resistance to cisplatin in a human melanoma cell line // Anticancer research. – 1997. – T. 17, No 4A. – C. 2347-2352.

493. Gao X., Asaumi J., Kawasaki S., Nishikawa K., Kuroda M., Takeda Y., Hiraki Y., Ihara M., Ohnishi T. Sensitivity of anticancer drugs in NIH3T3'cells transfected with oncogenes accompanied by pSV2neo vector // Anticancer research. – 1995. – T. 15,  $N_{\odot}$  5B. – C. 1911-1914.

494. Zhang F., Lau S. S., Monks T. J. The cytoprotective effect of N-acetyl-L-cysteine against ROS-induced cytotoxicity is independent of its ability to enhance glutathione synthesis // Toxicological sciences. – 2011. – T. 120, No 1. – C. 87-97.

495. Zaki S. M., Mohamed E., Motawie A. G., Fattah S. A. N-acetylcysteine versus progesterone on the cisplatin-induced peripheral neurotoxicity // Folia morphologica. – 2018. – T. 77, No 2. – C. 234-245.

496. Muldoon L. L., Walker-Rosenfeld S. L., Hale C., Purcell S. E., Bennett L. C., Neuwelt E. A. Rescue from enhanced alkylator-induced cell death with low molecular weight sulfur-containing chemoprotectants // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. -2001. - T. 296, No 3. - C. 797-805.

497. Quintanilha J. C., Visacri M. B., Sousa V. M., Bastos L. B., Vaz C. O., Guarnieri J. P., Amaral L. S., Malaguti C., Lima C. S., Vercesi A. E. Cisplatin-induced human peripheral blood mononuclear cells' oxidative stress and nephrotoxicity in head and neck cancer patients: the influence of hydrogen peroxide // Molecular and cellular biochemistry. -2018. - T. 440, No 1-2. - C. 139-145.

498. Wang L., Chanvorachote P., Toledo D., Stehlik C., Mercer R. R., Castranova V., Rojanasakul Y. Peroxide is a key mediator of Bcl-2 down-regulation and apoptosis induction by cisplatin in human lung cancer cells // Molecular pharmacology. – 2008. – T. 73,  $N_{2}$  1. – C. 119-127.

499. Hildeman D. A., Mitchell T., Aronow B., Wojciechowski S., Kappler J., Marrack
P. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species // Proceedings of the National
Academy of Sciences. – 2003. – T. 100, № 25. – C. 15035-15040.

500. Wang L., Chanvorachote P., Mercer R., Castranova V., Rojanasakul Y. Hydrogen peroxide mediates the apoptotic effect of cisplatin by d ownregulating bcl-2 through ubiquitin-proteasomal degradation // Book Hydrogen peroxide mediates the apoptotic effect of cisplatin by d ownregulating bcl-2 through ubiquitin-proteasomal degradation // EditorAACR, 2007.

501. Guyton K. Z., Liu Y., Gorospe M., Xu Q., Holbrook N. J. Activation of mitogenactivated protein kinase by ho role in cell survival following oxidant injury // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – T. 271,  $N_{2}$  8. – C. 4138-4142. 502. Choi B. K., Choi C. H., Oh H. L., Kim Y. K. Role of ERK activation in cisplatininduced apoptosis in A172 human glioma cells // Neurotoxicology. – 2004. – T. 25, № 6. – C. 915-924.

503. Jain A., Singh D., Dubey K., Maurya R., Mittal S., Pandey A. *In vitro* Toxicology //. – 2018.

504. Louis K. S., Siegel A. C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods // Mammalian cell viabilitySpringer, 2011. - C. 7-12.

505. Waterhouse N. J., Goldstein J. C., Von Ahsen O., Schuler M., Newmeyer D. D., Green D. R. Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process // The Journal of cell biology. -2001. - T. 153, No 2. -C. 319-328.

506. Komleva N., Lapshina M., Kostyuk G., Ivanov A., Parkhomenko I., Papina R., Sen V., Terentiev A. Comparative analysis of cytotoxic effects and intracellular accumulation of platinum (IV) nitroxyl complexes // Russian Chemical Bulletin. – 2015. – T. 64, No 5. – C. 1178-1182.

507. Jia Y., Zuo D., Li Z., Liu H., Dai Z., Cai J., Pang L., Wu Y. Astragaloside IV inhibits doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis mediated by mitochondrial apoptotic pathway via activating the PI3K/Akt pathway // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. -2014. -T. 62, N 1. -C. 45-53.

508. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // Journal of immunological methods. -1983. - T. 65, No 1-2. - C. 55-63.

509. Белова А., Орлова А., Брилкина А., Масленникова А. Чувствительность клеток линии HeLa Kyoto, трансфицированных сенсором HyPer2, к действию цисплатина // Современные технологии в медицине. – 2014. – Т. 6, № 4.

510. Kaneko I., Yamada N., Sakuraba Y., Kamenosono M., Tutumi S. Suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase, a primary target of β-amyloid, and its derivative racemized at Ser residue // Journal of neurochemistry. – 1995. – T. 65, № 6. – C. 2585-2593.

511. Pereira C., Santos M. S., Oliveira C. Metabolic inhibition increases glutamate susceptibility on a PC12 cell line // Journal of neuroscience research. – 1998. – T. 51,  $N_{\odot}$  3. – C. 360-370.

512. Satoh T., Isobe H., Ayukawa K., Sakai H., Nawata H. The effects of pravastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on cell viability and DNA production of rat hepatocytes // Life sciences. – 1996. – T. 59, № 14. – C. 1103-1108.

513. Bernas T., Dobrucki J. W. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC // Archives of Biochemistry and Biophysics. -2000. -T. 380, No 1. -C. 108-116.

514. Berridge M. V., Tan A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1993. – T. 303, No 2. – C. 474-482.

515. Goodwin C., Holt S., Riley P., Downes S., Marshall N. Growth hormoneresponsive DT-diaphorase-mediated bioreduction of tetrazolium salts // Biochemical and biophysical research communications. -1996. - T. 226, No 3. -C. 935-941.

516. Nisimoto Y., Otsuka-Murakami H. NADPH: nitroblue tetrazolium reductase found in plasma membrane of human neutrophil // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology. – 1990. – T. 1040, № 2. – C. 260-266.

517. Marshall N., Goodwin C., Holt S. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function // Growth regulation. – 1995. – T. 5, No 2. – C. 69-84.

518. Greenbaum L., Rothmann C., Lavie R., Malik Z. Green fluorescent protein photobleaching: a model for protein damage by endogenous and exogenous singlet oxygen // Biological chemistry. -2000. - T. 381, No 12. -C. 1251-1258.

519. Jiménez-Banzo A., Nonell S., Hofkens J., Flors C. Singlet oxygen photosensitization by EGFP and its chromophore HBDI // Biophysical journal. – 2008. – T. 94,  $N_{2}$  1. – C. 168-172.

520. Trewin A. J., Berry B. J., Wei A. Y., Bahr L. L., Foster T. H., Wojtovich A. P. Light-induced oxidant production by fluorescent proteins // Free Radical Biology and Medicine. – 2018. – T. 128. – C. 157-164.

521. Roy A., Carpentier P., Bourgeois D., Field M. Diffusion pathways of oxygen species in the phototoxic fluorescent protein KillerRed // Photochemical & Photobiological Sciences. -2010. - T. 9, No 10. - C. 1342-1350.

522. Goto H., Yang B., Petersen D., Pepper K. A., Alfaro P. A., Kohn D. B., Reynolds C. P. Transduction of green fluorescent protein increased oxidative stress and enhanced sensitivity to cytotoxic drugs in neuroblastoma cell lines // Molecular cancer therapeutics. -2003. - T. 2, No 9. - C. 911-917.

523. Freshni R. Y. Kul'tura zhivotnykh kletok [Animal cell culture] // Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy. – 2010. – T. 691.

524. Liu X., Chen H., Patel D. J. Solution structure of actinomycin-DNA complexes: drug intercalation at isolated GC sites // Journal of biomolecular NMR. – 1991. – T. 1,  $N_{2}$  4. – C. 323-347.

525. Nair S. V., Rupasinghe H. V. Fatty acid esters of phloridzin induce apoptosis of human liver cancer cells through altered gene expression // PLoS One. – 2014. – T. 9,  $N_{2}$  9. – C. e107149.

526. Schmid I., Uittenbogaart C., Jamieson B. D. Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D // Nature Protocols. -2007. - T. 2, No 1. - C. 187-190.

527. Zembruski N. C., Stache V., Haefeli W. E., Weiss J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry // Analytical biochemistry. – 2012. – T. 429, № 1. – C. 79-81.

528. Shirmanova M. V., Druzhkova I. N., Lukina M. M., Dudenkova V. V., Ignatova N. I., Snopova L. B., Shcheslavskiy V. I., Belousov V. V., Zagaynova E. V. Chemotherapy with cisplatin: insights into intracellular pH and metabolic landscape of cancer cells *in vitro* and *in vivo* // Scientific reports. – 2017. – T. 7, No 1. – C. 1-13.

529. Щукина К., Неруш А., Орлова А. Изменение уровня афк в клетках hela kyoto на разных стадиях цисплатин-индуцированной клеточной гибели // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2018. – Т. 3, № 4. – С. 699-705.

530. Practical flow cytometry. / Shapiro H. M.: John Wiley & Sons, 2005.

531. Cowden R., Curtis S. Microfluorometric investigations of chromatin structure // Histochemistry. – 1981. – T. 72, № 1. – C. 11-23.

532. Müller W., Crothers D. M. Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA // Journal of molecular biology. -1968. - T. 35, No 2. -C. 251-290.

533. Yin H., Sun G., Yang Q., Chen C., Qi Q., Wang H., Li J. NLRX1 accelerates cisplatin-induced ototoxity in HEI-OC1 cells via promoting generation of ROS and activation of JNK signaling pathway // Scientific reports. – 2017. – T. 7,  $N_{2}$  1. – C. 1-14. 534. Sancho-Martínez S. M., Piedrafita F. J., Cannata-Andía J. B., López-Novoa J. M., López-Hernández F. J. Necrotic concentrations of cisplatin activate the apoptotic machinery but inhibit effector caspases and interfere with the execution of apoptosis // Toxicological sciences. – 2011. – T. 122,  $N_{2}$  1. – C. 73-85.

535. Белова А., Мишина Н., Орлова А., Сергеева Е., Масленникова А., Брилкина А., Шахова Н., Белоусов В., Лукьянов С. Исследование влияния цисплатина на уровень пероксида водорода и рН в клетках линии HeLa Kyoto с использованием генетически-кодируемых сенсоров // Современные технологии в медицине. – 2013. – Т. 5, № 4.

536. Aruoma O. I., Halliwell B., Hoey B. M., Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid // Free Radical Biology and Medicine. – 1989. – T. 6,  $N_{2}$  6. – C. 593-597.

537. Fox R. B. Prevention of granulocyte-mediated oxidant lung injury in rats by a hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea // The Journal of clinical investigation. – 1984. – T. 74,  $N_{2}$  4. – C. 1456-1464.

538. Li W. Q., Dehnade F., Zafarullah M. Thiol antioxidant, N-acetylcysteine, activates extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in articular chondrocytes //

Biochemical and biophysical research communications. – 2000. – T. 275, № 3. – C. 789-794.

539. Wung B., Cheng J., Chao Y., Hsieh H., Wang D. Modulation of Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase pathway by reactive oxygen species is involved in cyclic strain-induced early growth response-1 gene expression in endothelial cells // Circulation research. – 1999. – T. 84,  $N_{\rm P}$  7. – C. 804-812.

540. Zafarullah M., Li W., Sylvester J., Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions // Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. – 2003. – T. 60,  $N_{2}$  1. – C. 6-20.

541. dos Santos N. A. G., Martins N. M., Curti C., Bianchi M. d. L. P., dos Santos A. C. Dimethylthiourea protects against mitochondrial oxidative damage induced by cisplatin in liver of rats // Chemico-biological interactions.  $-2007. - T. 170, N_{2} 3. - C. 177-186.$ 

542. Jiang M., Wei Q., Pabla N., Dong G., Wang C.-Y., Yang T., Smith S. B., Dong Z. Effects of hydroxyl radical scavenging on cisplatin-induced p53 activation, tubular cell apoptosis and nephrotoxicity // Biochemical pharmacology. – 2007. – T. 73,  $N_{2}$  9. – C. 1499-1510.

543. Tsuji T., Kato A., Yasuda H., Miyaji T., Luo J., Sakao Y., Ito H., Fujigaki Y., Hishida A. The dimethylthiourea-induced attenuation of cisplatin nephrotoxicity is associated with the augmented induction of heat shock proteins // Toxicology and applied pharmacology. -2009. - T. 234, No 2. - C. 202-208.

544. Vander Heide R. S., Sobotka P. A., Ganote C. E. Effects of the free radical scavenger DMTU and mannitol on the oxygen paradox in perfused rat hearts // Journal of molecular and cellular cardiology. – 1987. – T. 19,  $N_{2}$  6. – C. 615-625.

545. Moldeus P., Cotgreave I. A., Berggren M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine // Respiration. – 1986. – T. 50, № Suppl. 1. – C. 31-42.

546. Wang Z., Yang J., Qi J., Jin Y., Tong L. Activation of NADPH/ROS pathway contributes to angiogenesis through JNK signaling in brain endothelial cells // Microvascular Research. -2020. - C. 104012.

547. Korshunov S. S., Skulachev V. P., Starkov A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // FEBS letters. – 1997. – T. 416,  $N_{2}$  1. – C. 15-18.

548. Saad S. Y., Najjar T. A., Alashari M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats // Clinical and experimental pharmacology and physiology. – 2004. – T. 31,  $N_{\rm P}$  12. – C. 862-867.

549. Jing X.-B., Cai X.-B., Hu H., Chen S.-Z., Chen B.-M., Cai J.-Y. Reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential are modulated during CDDP-induced apoptosis in EC-109 cells // Biochemistry and cell biology. – 2007. – T. 85,  $N_{\rm P}$  2. – C. 265-271.