

На правах рукописи



КАЛИНИНА Елена Валентиновна

**РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ГЛУТАТИОН-ЗАВИСИМЫХ
ПРОЦЕССОВ В РАЗВИТИИ КЛЕТОЧНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ И ПРИ ТЕРАПИИ РЯДА ЗАБОЛЕВАНИЙ**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

23 ЯНВ 2009

Москва-2009

Работа выполнена на кафедре биохимии медицинского факультета Российского университета дружбы народов, в Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН и НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии.

Научные консультанты:

доктор биологических наук, профессор	Чернов Николай Николаевич
доктор медицинских наук, профессор	Комиссарова Ирина Алексеевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор	Ланкин Вадим Зиновьевич
Заслуженный деятель науки РФ, доктор биологических наук, профессор	Болдырев Александр Александрович
доктор биологических наук, профессор	Москалева Елизавета Юрьевна

Ведущая организация:

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Российский государственный медицинский университет

Защита состоится «20» февраля 2009 г. в «14⁰⁰» часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.13 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8, медицинский факультет

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Российского университета дружбы народов по адресу: 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

Автореферат разослан 15 января 2009г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.203.13
доктор биологических наук, профессор



Е.В. Лукашева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Окислительный (оксидативный) стресс связан с нарушением внутриклеточного баланса АФК/антиоксиданты, клеточного редокс-статуса и редокс-зависимого сигналинга наряду с активацией образования АФК, ростом свободнорадикальных и перекисных процессов, деструкцией клеточных структур (Владимиров Ю.В., Арчаков А.И., 1972; Козлов Ю.П., 1973; Эмануэль Н.М., 1982; Бурлакова Е.Б., 1985; Sies H., 1985; Осипов А.Н. и др., 1993; Halliwell V., Болдырев А.А., 1998; Gutteridge J.M.C., 1999; Ланкин В.З. и др., 2000; Lane N., 2002; Sies H., Jones D.P., 2006; Jones D.P., 2007; Меньщикова Е.Б. и др., 2008). В зависимости от силы и длительности воздействия окислительный стресс может вызывать гибель клеток, либо возможно включение адаптивных защитных механизмов, которые приводят к росту клеточного редокс-статуса, восстановлению редокс-зависимого сигналинга и появлению нового соотношения АФК/антиоксиданты. Важным условием возможности развития такого адаптивного антиоксидантного ответа является существование редокс-зависимых генов (Gabbita S.P. et al., 2000; Турпаев К.Т., 2002; Forman H.J. et al., 2002). Регуляция экспрессии редокс-чувствительных генов, механизмы развития адаптивного антиоксидантного ответа (в частности, как одного из важных факторов формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток), а также механизмы регуляции клеточной антиоксидантной защиты с помощью препаратов с антиоксидантным действием, используемых в терапии заболеваний, патогенетическим фактором которых является окислительный стресс, представляют собой перспективные направления в области изучения роли окислительного стресса в развитии ряда патологий, а также редокс-зависимых механизмов регуляции антиоксидантной защиты.

Одним из наиболее значительных ограничений эффективности химиотерапии рака является развитие множественной лекарственной устойчивости. Среди хорошо известных факторов, вызывающих развитие множественной лекарственной устойчивости, включая повышенную экспрессию трансмембранных транспортеров, повышение уровня системы детоксикации, в значительной степени связанной с ростом экспрессии глутатион-S-трансфераз, снижение экспрессии и активности топоизомеразы II, изменение экспрессии генов, блокирующее развитие апоптоза (Tew K.D., 1994; Hayes J.D. Pulford D.J., 1995; O'Connor P.M. et al., 1997; Ставровская А.А., 2000; Сергеев П.В. и др., 2002; Штиль А.А., 2003; Богуш Т.А. и др., 2003; Tsuruo T. et al., 2003; Pommier Y. et al., 2004), остаются малоизученными свободнорадикальные механизмы. Поэтому исследование роли адаптивного антиоксидантного ответа на прооксидантное действие противоопухолевых препаратов в формировании лекарственной резистентности опухолевых клеток, несомненно, имеет актуальное значение.

В настоящее время хорошо известно, что окислительный стресс является патогенетическим фактором развития целого ряда заболеваний (Cerutti P.A., 1994; Lankin V.Z., 1994; Hansen P.R., 1995; Reiter R.J., 1995; Repine J.E. et al., 1997; Ланкин В.З. и др., 2000; Bilenko M.V., 2001; Zalba G. et al., 2001; Barnes P.J. et al.,

2003; Madamanchi N.R. et al., 2005; Соодаева С.К., 2006; Sayre L.M. et al., 2008), включая кардиоваскулярные заболевания и хронические обструктивные заболевания легких. На существенный вклад свободнорадикальных процессов в патогенез таких заболеваний указывает ряд недавних эпидемиологических исследований, установивших, что повышение антиоксидантного статуса приводит к снижению риска их развития (Packer L., Cadenas E., 2007). В связи с тем, что снижение уровня глутатиона и антиоксидантных ферментов является одним из ведущих факторов в развитии процессов не только ишемической болезни сердца и хронического обструктивного бронхита, но и старения (Меньщикова Е.Б., 2008), большой интерес вызывают препараты, которые могут повышать содержание глутатиона и активировать глутатион-зависимые реакции. В связи с этим актуальными являются исследования роли глутатиона и редокс-зависимой регуляции в антиоксидантном действии препаратов, используемых в терапии пожилых больных ишемической болезнью сердца и хроническим обструктивным бронхитом.

Целью настоящей работы являлось исследование основных биохимических механизмов развития адаптивного антиоксидантного ответа при формировании лекарственной устойчивости опухолевых клеток, а также изучение роли глутатиона и редокс-зависимой регуляции в антиоксидантном действии препаратов, используемых в терапии пожилых больных ишемической болезнью сердца и хроническим обструктивным бронхитом.

Задачи исследования:

- оценить вклад антиоксидантных и глутатион-зависимых ферментов, ферментов тиоредоксин-зависимой системы, пероксиредоксинов и транскрипционного фактора Nrf2 в развитие адаптивного антиоксидантного ответа в клетках эритролейкемии человека K562, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и аденокарциномы яичника SKOV-3 при формировании резистентности к противоопухолевому препарату доксорубину, обладающему прооксидантным действием;
- исследовать изменение экспрессии генов ферментов, участвующих в синтезе глутатиона *de novo* и в его восстановлении из окисленной формы GSSG, при формировании резистентности опухолевых клеток к доксорубину;
- оценить характер изменения экспрессии генов ключевых ферментов, катализирующих одно- и двухэлектронное восстановление доксорубина, и белков, контролирующих внутриклеточный уровень ионов Fe^{2+} , в резистентных клетках K562/DOX, MCF-7/DOX, SKVLB. Исследовать влияние развития резистентности к доксорубину на внутриклеточный уровень свободного, связанного железа и образование АФК на примере клеток K562/DOX.
- исследовать характер изменения экспрессии генов белков семейства Bcl-2 – *BCL-2*, *BCL-x* и *BAX* в резистентных к доксорубину опухолевых клетках;
- исследовать влияние препаратов эмоксипина, мелатонина, элтацина на активность ферментов, контролирующих содержание глутатиона и соотношение GSH/GSSG, а также на активности антиоксидантных ферментов, глутаредоксина

- и тиоредоксина у пожилых больных стабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью;
- исследовать влияние элтаквина на содержание глутатиона и соотношение GSH/GSSG, активности антиоксидантных ферментов, глутаредоксина и тиоредоксина у пожилых больных хроническим обструктивным бронхитом.

Научная новизна работы.

Показано, что развитие адаптивного антиоксидантного ответа на прооксидантное действие доксорубина в резистентных клетках эритролейкемии человека K562/DOX, аденокарциномы молочной железы MCF-7/DOX, аденокарциномы яичника SKVLB зависит от генеза клеток и имеет разный характер скоординированного изменения экспрессии генов антиоксидантных ферментов и ферментов, контролирующих внутриклеточный уровень глутатиона, генов белков глутаредоксин- и тиоредоксин-зависимых систем, пероксиредоксина, белков транспорта и депонирования железа, ключевых ферментов, катализирующих одно- и двухэлектронное восстановление доксорубина.

Установлен скоординированный рост экспрессии генов ферментов, контролирующих синтез глутатиона (γ -глутамилцистеинсинтетазы, глутатионсинтетазы, γ -глутамилтрансферазы) и его восстановление из окисленной формы GSSG (глутатионредуктазы), в резистентных K562/DOX, MCF-7/DOX, SKVLB клетках и показан зависимый от генеза клеток рост экспрессии генов изоформ глутатионпероксидазы (GPx1, GPx4) и глутатион-S-трансферазы (GSTP1-1, GSTA4-4), обладающих антиоксидантными функциями.

Показано, что резистентность клеток K562/DOX, MCF-7/DOX, SKVLB к доксорубину связана с ростом экспрессии генов изоформ глутаредоксина (Grx1, Grx2) и пероксиредоксина 6, что демонстрирует усиление роли редокс-зависимых белков, окисленная форма которых восстанавливается глутатионом.

Показано, что изменение соотношения экспрессии генов НАДФН-цитохром-P-450редуктазы и НАД(Ф)Н:хинооксидоредуктазы 1 – ключевых ферментов, катализирующих, соответственно, одно- и двухэлектронное восстановление доксорубина, а также экспрессии генов, контролирующих транспорт (рецептор трансферрина 1) и депонирование (H- и L-субъединицы ферритина) ионов железа, приводит к снижению внутриклеточного уровня свободного и связанного железа, снижению образования АФК и способствует развитию адаптивного антиоксидантного ответа в резистентных клетках K562/DOX.

Установлено, что развитие антиоксидантного ответа на прооксидантное действие доксорубина в резистентных клетках K562/DOX, MCF-7/DOX, SKVLB связано с ростом внутриклеточного уровня транскрипционного фактора Nrf2.

Показано, что рост экспрессии гена *BCL-2* и снижение уровня мРНК *Вах-а* в клетках K562/DOX и SKVLB, а также повышение уровня мРНК *Bcl-xl* в клетках K562/DOX, MCF-7/DOX, SKVLB характеризуют развитие резистентности опухолевых клеток к доксорубину.

Продемонстрировано, что антиоксидантное действие препаратов эмоксипина, элтацина, мелатонина связано с повышением клеточного редокс-статуса, характеризуемого ростом соотношения GSH/GSSG, и редокс-зависимой регуляцией соотношения активности глутаредоксина и тиоредоксина в эритроцитах пожилых больных стабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью. Показано, что рост соотношения GSH/GSSG при действии эмоксипина и элтацина связан с индуцирующим влиянием на ферменты синтеза глутатиона и его восстановления из окисленной формы (γ -глутамилцистеинсинтетазу и глутатионредуктазу, соответственно).

Установлено, что антиоксидантное действие элтацина в терапии пожилых больных хроническим обструктивным бронхитом сопровождается ростом соотношения GSH/GSSG, а также повышением активности антиоксидантных ферментов (Cu,Zn-супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы) и редокс-зависимой регуляцией соотношения активностей глутаредоксина и тиоредоксина.

Научная и практическая значимость.

Настоящая работа вносит вклад в развитие фундаментальных знаний о механизмах формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Полученные данные о процессах, лежащих в основе развития адаптивного антиоксидантного ответа, как важном факторе формирования резистентности опухолевых клеток к противоопухолевому антибиотику доксорубину, расширяют существующие представления об особенностях развития лекарственной устойчивости опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам с прооксидантным действием и могут быть использованы для разработки практических подходов, направленных на повышение эффективности химиотерапии. В частности, установленные особенности изменения экспрессии генов, участвующих в формировании адаптивного антиоксидантного ответа в зависимости от генеза опухолевых клеток, могут служить основой для создания оригинальных схем комбинированной химиотерапии, позволяющей усиливать направленный противоопухолевый эффект путем оптимизации сочетания доз базового прооксидантного противоопухолевого препарата со временем введения и типом препаратов, корректирующих состояние антиоксидантной защитной системы.

В связи с тем, что патогенетическим фактором ишемической болезни сердца и хронических обструктивных болезней легких является окислительный стресс, а также учитывая тот факт, что снижение уровня глутатиона и антиоксидантных ферментов является одним из ведущих факторов в развитии процессов старения, практическое значение имеют полученные данные о характере антиоксидантного действия эмоксипина и элтацина у больных пожилого возраста. Данные об индуцирующем действии на внутриклеточный уровень глутатиона, росте соотношения GSH/GSSG, и редокс-зависимой регуляции соотношения активностей глутаредоксина и тиоредоксина, характеризующей снижение окислительного стресса, расширяют представления о действии этих препаратов у пожилых больных

стабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью и могут служить основой для практических рекомендаций с целью их широкого клинического использования.

Действие элтацина, вызывающее повышение внутриклеточного содержания глутатиона и клеточного редокс-статуса, характеризуемого ростом соотношения GSH/GSSG, а также повышение активности антиоксидантных ферментов (Cu,Zn-супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза) и редокс-зависимое изменение соотношения активностей глутаредоксина и тиоредоксина у больных хроническим обструктивным бронхитом пожилого возраста может служить рекомендацией к использованию этого препарата в качестве антиоксидантного адьюванта в терапии пожилых больных с данной нозологией.

Фармацевтическая композиция, индуцирующая биосинтез глутатиона, лежащая в основе действия элтацина, защищена патентом РФ № 2096034.

Положения, выносимые на защиту.

1. Значительный вклад в формирование резистентности клеток эритролейкемии человека K562, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и аденокарциномы яичника SKOV-3 к обладающему прооксидантным действием противоопухолевому препарату доксорубину вносит развитие адаптивного антиоксидантного ответа, который зависит от генеза клеток и имеет разный характер скоординированного изменения экспрессии генов антиоксидантных ферментов и ферментов, контролирующих внутриклеточный уровень глутатиона, а также генов белков глутаредоксин- и тиоредоксин-зависимых систем, пероксиредоксинов, белков транспорта и депонирования железа, ключевых ферментов, катализирующих одно- и двухэлектронное восстановление доксорубина.

2. В развитии адаптивного антиоксидантного ответа на прооксидантное действие доксорубина в резистентных клетках K562/DOX, MCF-7/DOX, SKVLB важную роль играют глутатион-зависимые процессы, что обусловлено ростом экспрессии генов ферментов, которые контролируют синтез глутатиона (γ -глутамилцистеинсинтетаза, глутатионсинтетаза, γ -глутамилтрансферазы) и его восстановление из окисленной формы GSSG (глутатионредуктаза), а также генов глутатион-зависимых ферментов (глутатионпероксидаза, глутатионS-трансферазы, глутаредоксина), обладающих антиоксидантными функциями.

3. Изменение соотношения экспрессии генов НАДФН-цитохром-P-450 редуктазы и НАД(Ф)Н:хиноноксидоредуктазы I – ключевых ферментов, катализирующих, соответственно, одно- и двухэлектронное восстановление доксорубина, и экспрессии генов, контролирующих транспорт (трансферриновый рецептор1) и депонирование (H- и L-субъединицы ферритина) ионов железа, приводит к снижению внутриклеточного уровня свободного и связанного железа, снижению образования АФК и способствует развитию адаптивного антиоксидантного ответа в резистентных клетках K562/DOX.

4. Развитие антиоксидантного ответа на прооксидантное действие доксорубина в резистентных клетках K562/DOX, MCF-7/DOX, SKVLB связано с ростом внутриклеточного уровня транскрипционного фактора Nrf2.

5. Рост экспрессии гена *BCL-2* и снижение уровня мРНК Вах- α в клетках K562/DOX и SKVLB, а также рост уровня мРНК Bcl-x1 в клетках K562/DOX, MCF-7/DOX, SKVLB характеризуют развитие резистентности опухолевых клеток к доксорубину.

6. Использование препаратов эмоксипина, элтацина, мелатонина в терапии пожилых больных стабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью вызывает повышение клеточного редокс-статуса эритроцитов, характеризуемого ростом соотношения GSH/GSSG, и изменение активности редокс-зависимых белков – рост активности глутаредоксина при снижении активности тиоредоксина, что свидетельствует об уменьшении окислительного стресса под влиянием этих препаратов. В отличие от мелатонина рост соотношения GSH/GSSG при использовании эмоксипина и элтацина связан с индуцирующим влиянием на ферменты синтеза глутатиона (γ -глутамилцистеинсинтетазу) и его восстановления из окисленной формы (глутатионредуктазу).

7. Использование элтацина в терапии пожилых больных хроническим обструктивным бронхитом приводит к росту антиоксидантного статуса эритроцитов, что сопровождается повышением внутриклеточного содержания GSH, соотношения GSH/GSSG, активности антиоксидантных ферментов (Cu,Zn-супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы) и редокс-зависимым изменением соотношения глутаредоксина и тиоредоксина – ростом и снижением их активности, соответственно.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на International ISSX-Workshop on Glutathione S-transferases (Noordwijkerhout, The Netherlands, 1995); 6th European ISSX Meeting (Gothenburg, Sweden, 1997); 7th European ISSX Meeting (Budapest, Hungary, 1999); 6th International Conference on Glutathione S-transferases (Uppsala, Sweden, 2000); International ISSX Meeting (Munich, Germany, 2001); Национальной научно-практической конференции с международным участием "Свободные радикалы, антиоксиданты и болезни человека" (Смоленск, 2001, 2005, 2006, 2007); 6th Международной конференции "Биоантиоксидант" (Москва, 2002); Международном симпозиуме "Reactive oxygen and nitrogen species: diagnostic, preventive and therapeutic values" (Санкт-Петербург, 2002); 11th Meeting of the Society for Free Radical Research International (Париж, Франция, 2002); 3 Симпозиуме «Биологические основы терапии онкогематологических заболеваний у детей» (Москва, 2002); 6th International Dead Sea Symposium on Cardiac Arrhythmias and Device Therapy (Tel Aviv, Israel, 2002); 11th International Congress on Cardiovascular Pharmacotherapy (Montreal, Canada, 2002); 23rd Congress of the European Atherosclerosis Society (Salzburg, Austria, 2002); 8th European ISSX Meeting (Dijon, France, 2003); Научно-практической конференции

«Медико-биологические науки для теоретической и клинической медицины» (Москва, 2003); 3 Съезде биофизиков России (Воронеж, 2004); 38th Annual Meeting of the European Society for Clinical Investigation (Utrecht, the Netherlands, 2004); International Conference on Acute Cardiac Care (Rome, Italy, 2004); 7th International ISSX Meeting (Vancouver, Canada, 2004); 4 Симпозиуме «Биологические основы терапии онкологических заболеваний» (Москва, 2004); 9th International Congress on Amino Acids and Proteins (Vienna, Austria, 2005); 39th Annual Meeting of the European Society for Clinical Investigation (Athens, Greece, 2005); 14th European Bioenergetics Conference (Moscow, Russian Federation, 2006); 2nd Annual Congress of European Cardiac Arrhythmia Society (Marseille, France, 2006); 7th International Conference on Biological Reactive Intermediates, Human Health and Disease (Tucson, Arizona, USA, 2006); 14 и 15 Международной конференции и дискуссионном научном клубе «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Ялта-Гурзуф, Крым, Украина, 2006, 2007); 4 Крымской конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Судак, Крым, Украина, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 75 работ. В ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК, опубликованы 22 статьи. Получен патент РФ.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 230 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, двух глав результатов исследования, заключения, выводов и списка литературы, который включает 577 источников, из них 526 зарубежных. Диссертация содержит 32 рисунка и 19 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Культуры клеток. Условия культивирования. Работа выполнена на клеточных линиях: эритролейкемии человека K652 (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и аденокарциномы яичника человека SKOV-3 (Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения) – чувствительных (K562/S, MCF-7/S, SKOV-3 с IC₅₀ – 0,005, 0,008, 0,2 мкг/мл, соответственно) и резистентных к DOX (K562/DOX, MCF-7/DOX, SKVLB с IC₅₀ – 4,0, 4,1, 4,5 мкг/мл, соответственно). Клетки линии K652 культивировали в виде суспензии в среде RPMI 1640 (“Sigma”, США), клетки MCF-7 и SKOV-3 в виде монослоя в среде DMEM (“Sigma”, США) – во всех трех случаях с добавлением 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (“Gibco BRL”, Англия), 2мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Резистентность клеток к DOX получена путём ступенчатого повышения концентрации цитостатика в культуральной среде. В экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста.

Оценка содержания GSH и GSSG, соотношения GSH/GSSG, активности антиоксидантных ферментов, глутаредоксина и тиоредоксина в эритроцитах пожилых больных стабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью при использовании в терапии препаратов эмоксипина, мелатонина, элтацина. Работа выполнена в городской клинической больнице № 60 под руководством профессора Заславской Р.М. как часть сравнительного исследования действия эмоксипина, мелатонина, элтацина у больных пожилого возраста, страдающих одновременно стабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью (II – III функционального класса по классификации NYHA), в четырех рандомизированных группах. Активности антиоксидантных ферментов (Cu,Zn-SOD, каталазы, глутатионпероксидазы), тиоредоксина и глутаредоксина, содержание GSH и GSSG, соотношение GSH/GSSG оценивали в эритроцитах больных до и после применения комплексно с базисной терапией в течение 21 суток исследуемых препаратов: элтацина (22 больных, 13 мужчин и 9 женщин, средний возраст $71,6 \pm 10,2$ лет) в дозе 220 мг три раза в сутки сублингвально; эмоксипина (21 больных, 9 мужчин и 12 женщин, средний возраст $68,3 \pm 3,2$ лет) первые 5 дней – однократно по 20 мл 3% раствора внутривенно капельно, в последующие дни – 3 мл 3% раствора двукратно внутримышечно; мелатонина в дозе 3 мг (21 больной, 7 мужчин и 14 женщин, средний возраст $70,8 \pm 9,5$ лет) однократно в 22 часа; одной базисной терапии (21 больной, 10 мужчин и 11 женщин, средний возраст $71,2 \pm 2,4$ лет), которая включала нитраты, β -адреноблокаторы, антиагреганты, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, диуретики.

Оценка содержания GSH и GSSG, соотношения GSH/GSSG, активности антиоксидантных ферментов, глутаредоксина и тиоредоксина в эритроцитах пожилых больных хроническим обструктивным бронхитом при использовании в терапии элтацина. Работа выполнена в городской клинической больнице №60 под руководством профессора Заславской Р.М. как часть исследования действия элтацина у больных хроническим обструктивным бронхитом пожилого возраста в городской клинической больнице № 60. Активности антиоксидантных ферментов (Cu,Zn-SOD, каталазы, глутатионпероксидазы), тиоредоксина и глутаредоксина, содержание GSH и GSSG, соотношение GSH/GSSG оценивали в эритроцитах больных до и через 16 суток применения элтацина комплексно с базисной терапией (рандомизированная группа из 14 больных, 10 мужчин и 4 женщины, средний возраст $67,7 \pm 3,2$ лет) в дозе 220 мг три раза в сутки сублингвально и базисной терапии (рандомизированная группа из 14 больных, 11 мужчин и 3 женщины, средний возраст $66,4 \pm 4,8$ лет), которая включала эуфиллин, антибиотики, муколитические препараты.

Уровень образования $O_2^{\cdot -}$ оценивали по флуоресценции этидия (λ возбуждения – 488 нм, λ эмиссии – 600 нм), образующегося в результате окисления дигидроэтидия при действии $O_2^{\cdot -}$ и флуоресцирующего после интеркаляции в ДНК (Benov L. et al., 1998).

Люминол-зависимая хемиллюминесценция. Возможность активации в клетках окислительного стресса, индуцированного ФМА, исследовали методом хемиллюминесценции с использованием люминесцентного зонда люминола. Измерения проводили в среде культивирования на сцинтилляционном счетчике MARK-II (Nuclear Chicago, США).

ЭПР-спектроскопия. Регистрацию спектров ЭПР проводили на спектрометре X-диапозона ECS-106 «Bruker» с использованием замороженных при -196°C клеток. Спектры ЭПР нитрозильных комплексов свободного негемового железа ($g = 2,03$) регистрировали после предварительной инкубации резистентных и чувствительных клеток с 10 мМ нитрозоглутатионом в течение 5 мин и последующего замораживания при -196°C . Для регистрации спектров ЭПР негемового связанного железа ($g = 4,3$) использовали метод предварительного "искусственного старения" клеток посредством двукратного замораживания-размораживания.

Активности ферментов определяли спектрофотометрически:

- **активность *Cu,Zn*-супероксиддисмутазы** – по восстановлению цитохрома *c* в системе кантин-кантинооксидаза (McCord J.M., Fridovich I., 1969);
- **активность *Mn*-супероксиддисмутазы** – по скорости восстановления цитохрома *c* в системе кантин-кантинооксидаза в присутствии 1мМ цианида натрия (McCord J.M., Fridovich I., 1969);
- **активность каталазы** – по убыли H_2O_2 (Aebi H. et al., 1969);
- **активность глутатионпероксидазы** – по скорости окисления НАДФН, используя в качестве субстратов гидроперекись кумола, H_2O_2 , гидроперекись третбутила, гидроперекись фосфатидилхолина (Paglia D.F., Valentine W.N., 1967);
- **активность глутатион-S-трансферазы** – по образованию продукта реакции GSH с субстратами – 1-хлор-2,4-динитробензолом, этакриновой кислотой, 4-гидрокси-2,3-ноненалем (Habin W.H. et al., 1974);
- **активность глутатионредуктазы** – по убыли НАДФН в присутствии субстрата GSSG (Carlberg I., Mannervik B., 1975);
- **активность НАД(Ф)Н:хиноноксидоредуктазы 1** – по скорости окисления НАДФН, используя в качестве субстрата менадион дисульфат (Ernster L., 1967);
- **активность НАДФН-цитохром P-450-редуктазы** – по методу НАДФН-зависимого восстановления цитохрома *c*- Fe^{3+} (Strobel H.W., Dignam J.D., 1978);
- **активность глутаредоксина** – по скорости окисления НАДФН, используя в качестве субстрата гидроксиэтилдисульфид (Holmgren, A., Åslund, F., 1995);
- **активность тиоредоксина** – по скорости окисления НАДФН, используя в качестве субстрата инсулин (Holmgren, A., Åslund, F., 1995);
- **активность тиоредоксинредуктазы** – по НАДФН-зависимому восстановлению 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) (Luthman M., Holmgren A., 1982);
- **активность γ -глутамилтрансферазы** – по скорости образования *n*-нитроанилина (Tate S.S., Meister A., 1985).

Концентрацию белка и гемоглобина определяли по методу Lowry (Lowry et al., 1951) и гемоглобинцианидным методом (van Kampen E.J., Zijlstra W.G., 1961), соответственно.

Содержание общего глутатиона (GSH + GSSG) оценивали по восстановлению 5,5-дитионитробензойной кислоты в присутствии глутатионредуктазы (Tietze F., 1969).

Содержание окисленного глутатиона (GSSG) оценивали по восстановлению 5,5-дитионитробензойной кислоты в присутствии глутатионредуктазы после предварительного связывания GSH 2-винилпиридином (Griffith O.W., 1980).

Внутриклеточное содержание Bcl-2, Bcl-xl, β -актина, Nrf-2 оценивали с помощью метода Вестерн-блоттинга (Towbin H. et al., 1979), используя моноклональные антитела (Bcl-2-100; Sigma, США; 2H12, Sigma, США; AC-40, Sigma, США), соответственно, и поликлональные антитела к Nrf-2 (клон H-300, Santa Cruse, США), в качестве вторичных антител – антитела к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США). Для определения относительного содержания исследуемого белка использовали данные денситометрии и в качестве положительного контроля – уровень β -актина.

Уровень транскрипции генов оценивали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Уровень мРНК рассчитывали относительно уровня мРНК β -актина

Статистический анализ результатов. Для оценки статистической значимости различий использовали t - критерий Стьюдента и непараметрический критерий Вилкоксона. Использованы программные статистические пакеты Statistica 6.0, BioStat.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. РАЗВИТИЕ АДАПТИВНОГО АНТИОКСИДАНТНОГО ОТВЕТА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ РЕЗИТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ДОКСОРУБИЦИНУ

Экспрессия генов антиоксидантных ферментов при формировании резистентности опухолевых клеток к доксорубину.

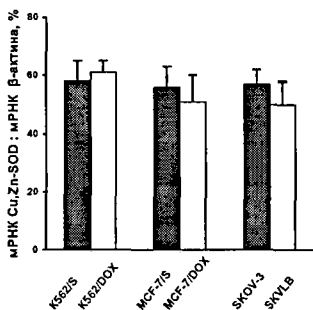
Представленные в данной работе результаты демонстрируют существенные изменения в экспрессии генов, связанных с антиоксидантной защитой, при формировании резистентности к обладающему прооксидантным действием DOX клеток трех клеточных линий различного генеза: эритролейкемии человека K562, аденокарциномы яичника человека SKOV-3, аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

Исходно имея разную чувствительность к цитотоксическому действию DOX (IC_{50} – 0,005, 0,008, 0,2 мкг/мл для клеток K562/S, MCF-7/S, SKOV-3, соответственно) при практически одинаковом уровне резистентности (IC_{50} – 4,0,

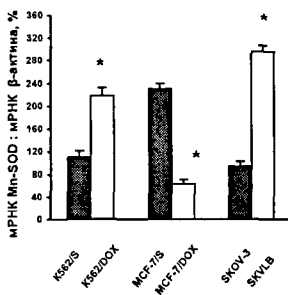
4,1, 4,5 мкг/мл для клеток K562/DOX, MCF-7/DOX, SKVLB, соответственно), исследуемые линии опухолевых клеток проявляют разный тип адаптивного антиоксидантного ответа в результате развития лекарственной резистентности.

Так, в резистентных клетках K562/DOX и SKVLB обнаружен существенный рост экспрессии генов *SOD2* и *CAT* в отличие от гена *SOD1* по сравнению с чувствительными клетками (рис. 1, А, Б, В). Напротив, развитие резистентности клеток MCF-7 к DOX приводит к другому соотношению изменения экспрессии ключевых антиоксидантных ферментов – снижению уровня мРНК и активности Mn-SOD и каталазы (рис. 1; таблица 1). По-видимому, можно считать справедливым предположение Akman S.A. с соавт. (Akman S.A. et al., 1990) о значительной специфичности развития резистентности клеток MCF-7 к DOX. Определенным подтверждением такого предположения можно считать и практическое отсутствие изменения в клетках MCF-7/DOX экспрессии гена *HO-1* (рис. 1, Г), повышение экспрессии которого расценивается как адаптивный и протекторный ответ на окислительный стресс (Ryter S.W. et al., 2006). В то же время существенный рост уровня мРНК HO-1 в резистентных клетках K562/DOX и в меньшей степени в клетках SKVLB, по-видимому, может служить отражением степени развития адаптивного антиоксидантного ответа.

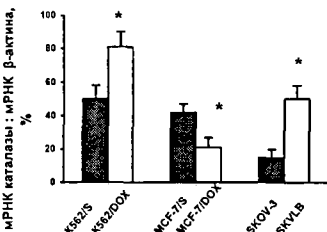
А



Б



В



Г

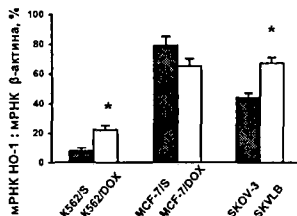


Рис. 1. Влияние формирования резистентности опухолевых клеток к доксорубину на экспрессию генов антиоксидантных ферментов. Представлено относительное содержание мРНК Cu,Zn-SOD (А), Mn-SOD (Б), каталазы (В), HO-1 (Г) по отношению к мРНК β-актина (%). n = 4; * p < 0,05.

Таблица 1.
Активности антиоксидантных ферментов в чувствительных (K562/S, MCF-7/S, SKOV-3) и резистентных (K562/DOX, MCF-7/DOX, SKVLB) к доксорубину опухолевых клетках.

Тип клеток	Активности ферментов		
	Cu,Zn-SOD, ед/мг белка	Mn-SOD, ед/мг белка	каталаза, мкмоль/мин · мг белка
K562/S	10,1 ± 0,6	4,11 ± 0,91	12,9 ± 1,1
K562/DOX	13,1 ± 1,1*	10,3 ± 1,3**	16,8 ± 1,2*
MCF-7/S	7,53 ± 0,86	6,02 ± 1,20	9,72 ± 1,02
MCF-7/DOX	8,74 ± 1,10	1,22 ± 0,48**	3,61 ± 0,88**
SKOV-3	13,3 ± 1,1	4,61 ± 0,74	6,43 ± 1,12
SKVLB	22,7 ± 1,2	16,4 ± 1,3***	13,2 ± 1,2**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – достоверность различий с данными для чувствительных клеток каждой линии; $n = 5 - 7$.

GSH и GSH-зависимые ферменты в формировании резистентности опухолевых клеток к доксорубину

Характерным для всех трех исследуемых линий опухолевых клеток является значительный рост экспрессии генов ключевых ферментов синтеза GSH *de novo* – γ -глутамилцистеинтрансферазы, глутатионсинтазы (рис. 2; таблица 2). У всех трех линий резистентных клеток установлен рост уровня мРНК как регуляторной γ -GCSL, так и каталитической γ -GCSH субъединиц γ -GCS – скорость-лимитирующего фермента в синтезе GSH, катализирующего образование γ -глутамилцистеина (Pastore A. et al., 2003) (рис. 2, А, Б). Рост экспрессии генов γ -GCSL и γ -GCSH у всех трех исследуемых типов резистентных клеток скоординирован с ростом экспрессии гена глутатионсинтазы (рис. 2, В), катализирующей образование GSH из γ -глутамилцистеина и глицина, что создает оптимальные условия для синтеза GSH *de novo*. Усиливает этот эффект рост экспрессии гена γ -глутамилтрансферазы (рис. 2, Г; таблица 2), который отмечен как результат развития резистентности к DOX у всех трех клеточных линий. γ -GT осуществляет транспорт γ -глутамильных групп в клетку, а также поддерживает внутриклеточную концентрацию цистеина, который наряду с уровнем активности γ -GCS является фактором, лимитирующим синтез GSH (Pompella A. et al., 2006).

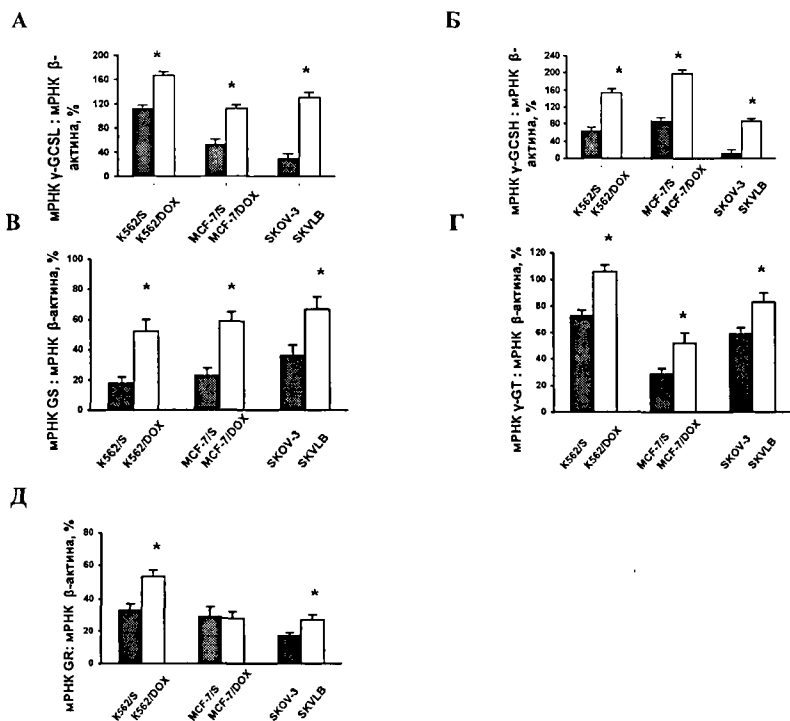


Рис. 2. Влияние формирования резистентности опухолевых клеток к доксорубину на экспрессию генов ферментов, контролирующих внутриклеточное содержание GSH. Представлено относительное содержание мРНК L-субъединицы γ -GCS (А), H-субъединицы γ -GCS (Б), GS (В), γ -GT (Г), GR (Д), по отношению к мРНК β -актина (%). $n = 4$; * $p < 0,05$.

Таблица 2.

Активности γ -глутамилцистенсинсинтазы, γ -глутамилтрансферазы, глутатионредуктазы в чувствительных и резистентных к доксорубину опухолевых клетках.

Активность фермента, нмоль/мин · мг	Тип клеток					
	K562/S	K562/DOX	MCF-7/S	MCF-7/DOX	SKOV-3	SKVLB
γ -GCS	121 ± 21	218 ± 31*	48 ± 8	68 ± 6*	109 ± 27	262 ± 45*
γ -GT	10,9 ± 1,2	14,5 ± 1,4*	2,4 ± 0,4	3,9 ± 0,6*	8,1 ± 1,0	11,2 ± 1,2*
GR	1,47 ± 0,38	2,37 ± 0,26*	1,87 ± 0,29	1,74 ± 0,36	0,84 ± 0,11	1,26 ± 0,14*

* $p < 0,05$ – достоверность различий с данными для чувствительных клеток каждой линии; $n = 7$

Таблица 3.

Содержание GSH, GSSG и соотношение GSH/GSSG в чувствительных и резистентных к доксорубину опухолевых клетках.

Тип клеток	GSH нмоль/мг белка	GSSG нмоль/мг белка	GSH/GSSG	<u>GSH/GSSG рез. клетки</u> GSH/GSSG чув. клетки
K562/S	37,2 ± 5.2	0,65 ± 0.07	57 ± 5	
K562/DOX	55,4 ± 4.5*	0,35 ± 0.04*	158 ± 5**	2,8
MCF-7/S	27,1 ± 3.2	0,87 ± 0.09	31 ± 3	
MCF-7/DOX	15,8 ± 2.1*	0,43 ± 0.08*	37 ± 2	1,2
SKOV-3	11,4 ± 2.7	0,75 ± 0.06	15 ± 3	
SKVLB	19,3 ± 3.5*	0,45 ± 0.05*	43 ± 4**	2,9

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ – достоверность различий с данными для чувствительных клеток каждой линии; $n = 7$.

Уровень GSH в клетке поддерживается также за счет его восстановления из окисленной формы GSSG, катализируемого глутатионредуктазой. Однако рост уровня мРНК GR (рис. 2, Д) и ее активности (таблица 2) установлен только у K562/DOX и SKVLB клеток. Изменение экспрессии гена *GSR* у клеток MCF-7/DOX практически отсутствует. Тем не менее в клетках MCF-7/DOX, несмотря на отсутствие изменения активности GR, наблюдается снижение уровня GSSG, которое происходит на фоне снижения уровня GSH в отличие от клеток K562/DOX и SKVLB, у которых снижение уровня GSSG обнаружено наряду с ростом внутриклеточного содержания GSH, что определяет рост соотношения GSH/GSSG в этих клетках, тогда как в клетках MCF-7/DOX оно мало отличается от такового у чувствительных клетках (таблица 3).

У всех трех исследуемых типов резистентных клеток обнаружен рост экспрессии генов изоформ глутатионтрансферазы (GSTP1-1, GSTA4-4), глутатионпероксидазы (GPx1, GPx4) и глутаредоксина (Gtx1, Gtx2), имеющий зависимость от генеза клеток характер (рис. 3). Максимальный рост уровня мРНК изоформы GPx1 (субстратами для которой являются H_2O_2 , пероксинитрит, органические гидроперекиси, включая гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот) отмечен для MCF-7/DOX клеток (рис. 3, А), тогда как в клетках SKVLB обнаружен максимальный рост уровня мРНК изоформы GPx4, которая способна восстанавливать гидроперекиси фосфолипидов, холестерина, жирных кислот (рис. 3, Б). В отличие от клеток MCF-7/DOX, где отмечен наиболее высокий рост экспрессии гена изоформы GSTP1-1, обладающей высокой активностью по отношению к продуктам перекисного окисления ДНК и липидов (Berhane K. et al., 1994) (рис. 3, В), в клетках K562/DOX и SKVLB обнаружен доминирующий рост экспрессии гена изоформы GSTA4-4 (рис. 3, Г), защищающей клетки от продукта перекисного окисления липидов – 4-гидрокси-2,3-ноненаля (Desmots F. et al., 2002).

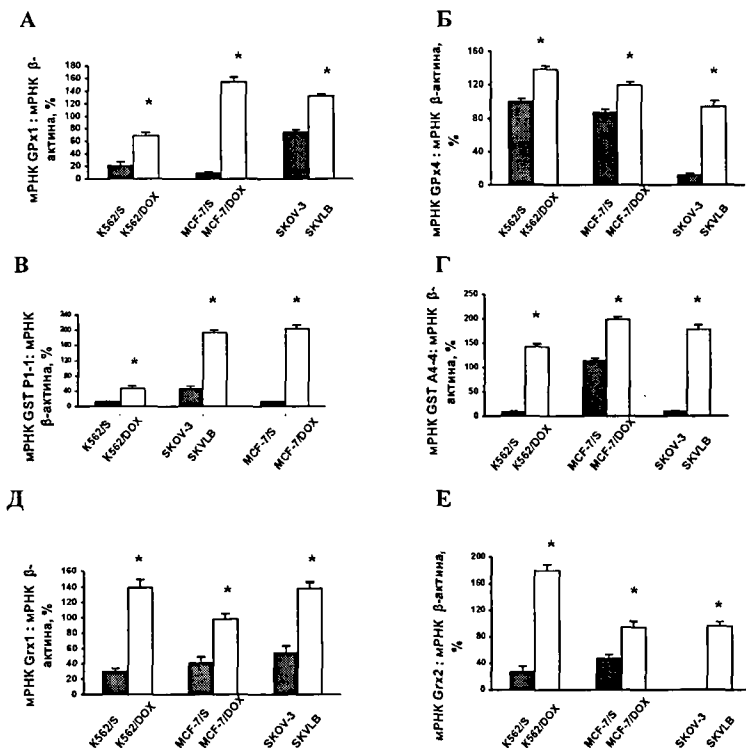


Рис. 3. Влияние формирования резистентности опухолевых клеток к доксорубину на экспрессию генов GSH-зависимых ферментов, связанных с антиоксидантной защитой. Представлено относительное содержание мРНК GPx1 (А), GPx4 (Б), GSTP1-1 (В), GSTA4-4 (Г), Grx1 (Д), Grx2 (Е) по отношению к мРНК β -актина (%). $n = 4$; * $p < 0,05$.

В отличие от практически одинакового роста экспрессии цитозольной изоформы Grx1 (рис. 3, Д) у всех трех исследуемых типов резистентных клеток развитие резистентности к DOX вызвало значительное различие в изменении экспрессии гена митохондриальной изоформы Grx2 (рис. 3, Е), обладающей как и Grx1 высокой специфичностью по отношению к смешанным дисульфидам, – более высокий по сравнению с клетками MCF-7/DOX рост уровня мРНК Grx2 установлен в клетках K562/DOX. В резистентных клетках SKVLB уровень мРНК Grx2 совпадал с таковым в клетках MCF-7/DOX, тогда как в чувствительных клетках SKOV-3 – не детектировался.

Роль тиоредоксина, тиоредоксинредуктазы и пероксиредоксина в развитии адаптивного антиоксидантного ответа в опухолевых клетках, резистентных к доксорубину.

Развитие резистентности к DOX приводило к заметному изменению экспрессии таких редокс-зависимых белков как тиоредоксин и пероксиредоксин (рис. 4). У всех трех исследуемых типов резистентных клеток обнаружен рост экспрессии гена митохондриальной изоформы тиоредоксина – Тгх2 (рис. 4, А), который восстанавливает дисульфиды, может быть «ловушкой» [•]ОН радикалов, совместно с пероксиредоксином 3 участвует в катаболизме H₂O₂, что значительно усиливает антиоксидантную защиту митохондрий и наряду со способностью блокировать выход цитохрома с препятствует развитию апоптоза при действии окислительного стресса (Das K.C., 2000; Rhee S.G. et al., 2001; Tanaka T. et al., 2002).

Следует отметить значительный рост экспрессии гена тиоредоксинредуктазы 1 во всех резистентных клетках (рис. 4, Б), подчеркнув, что ТгхR1 не только служит кофактором Тгх1, восстанавливая его окисленную форму, но и обладает самостоятельной антиоксидантной активностью – способностью восстанавливать H₂O₂ и гидроперекиси липидов в присутствии НАДФН (Bjornstedt M. et al., 1995).

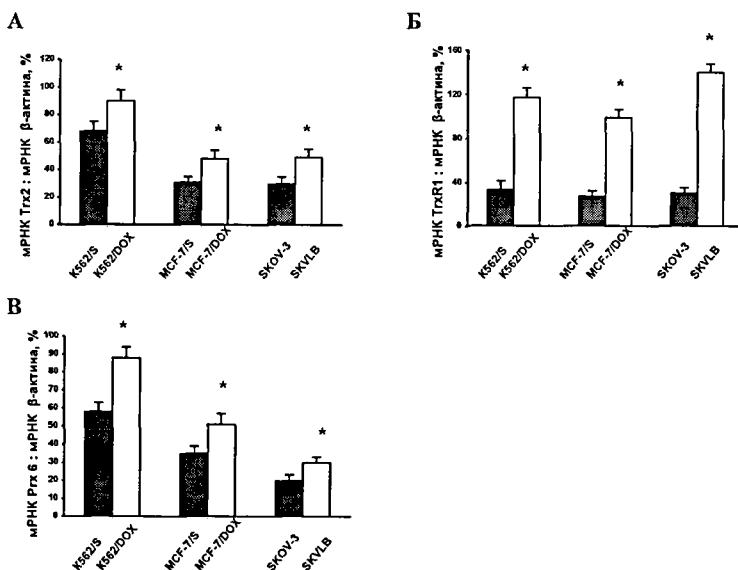


Рис. 4. Влияние формирования резистентности опухолевых клеток к доксорубину на экспрессию генов тиоредоксина 2 (А), тиоредоксинредуктазы 1 (Б), пероксиредоксина 6 (В). Представлено относительное содержание мРНК фермента по отношению к мРНК β-актина (%). n = 4; *p < 0,05.

У всех резистентных клеток установлен рост экспрессии гена изоформы пероксиредоксина – Prx 6 (рис. 4, В), что также может служить определенным подтверждением усиления роли GSH-зависимых процессов для данного типа лекарственной устойчивости опухолевых клеток, так как окисленную форму изоформы Prx 6 восстанавливает GSH наряду с низкомолекулярными тиолами в отличие от других изоформ Prx, для которых источником электронов служит Tgх (Manevich Y., Fisher A.B., 2005). Важность роли Prx 6 в антиоксидантной защите демонстрирует его способность восстанавливать не только H₂O₂, но также гидропероксиды фосфолипидов жирных кислот, а также способность служить защитой от [•]ОН радикалов (Manevich Y. et al., 2002).

Изменение экспрессии генов ключевых ферментов, участвующих в одноэлектронном и двухэлектронном восстановлении доксорубина, в резистентных к доксорубину опухолевых клетках

Проведена оценка уровня экспрессии гена НАДФН-цитохром Р-450 редуктазы – ключевого фермента, осуществляющего одноэлектронное восстановление хинона в структуре DOX, что приводит к образованию семихионных радикалов, быстро автоокисляющихся в присутствии молекулярного кислорода с образованием O₂⁻ и последующей генерацией H₂O₂ и [•]ОН.

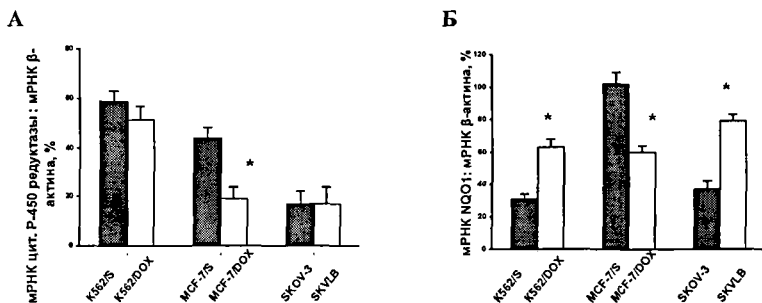


Рис. 5. Влияние формирования резистентности опухолевых клеток к доксорубину на экспрессию генов НАДФН-цитохромР-450редуктазы (А) и НАД(Ф)Н:хиноноксидоредуктазы 1 (Б). Представлено относительно содержание мРНК фермента по отношению к мРНК β-актина (%). n = 4; *p < 0,05.

Обнаружено существенное снижение уровня мРНК (рис. 5, А) и активности НАДФН-цитохром Р-450 редуктазы (таблица 4) в резистентных клетках MCF-7/DOX в отличие от клеток K562/DOX и SKVLB, у которых установлен рост уровня мРНК (рис. 5, Б) и активности НАД(Ф)Н:хиноноксидоредуктазы 1 (таблица 4), катализирующей двухэлектронное восстановление хинонов с образованием гидрохинонов, легко элиминирующихся из клеток в виде неактивных глюкуронатов и конъюгатов с глутатионом (такие метаболиты установлены для

DOX) (Sinha B.K., Gregory J.L., 1981; Takanashi S., Bachur N.R., 1976). Кроме того, весьма значительным является антиоксидантный эффект, который может вызываться НАД(Ф)Н:хинооксидоредуктазой 1 благодаря восстановлению эндогенных хинонов, в частности убихинона (коэнзима Q) в убихинол, что повышает защиту клеточных мембран от окислительного стресса, наряду с восстановлением α -токоферолхинона, образующегося в результате перекисного окисления α -токоферола (Dinkova-Kostova A.T., Talalay P., 2000).

Таблица 4.

Активность НАДФН-цитохром Р-450 редуктазы и НАД(Ф)Н:хинооксидоредуктазы I в чувствительных и резистентных к доксорубину опухолевых клетках.

Активность фермента, нмоль/мин · мг	Тип клеток					
	K562/S	K562/DOX	MCF-7/S	MCF-7/DOX	SKOV-3	SKVLB
цит. Р-450 редуктаза	5,32±0,39	4,46 ± 0,32	5,69 ± 0,42	2,38 ± 0,28*	4,32 ± 0,46	4,47 ± 0,53
NQO1	123± 22	242 ± 36*	239 ± 19	125 ± 42*	156 ± 38	393 ± 40**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – достоверность различий с данными для чувствительных клеток каждой линии; $n = 7$

Влияние формирования резистентности опухолевых клеток к доксорубину на систему транспорта и депонирования железа.

Тот факт, что DOX вызывает нарушение регуляции трансляции трансферрина и ферритина (Xu X. et al., 2005), приводя к росту внутриклеточного уровня Fe^{2+} -индуцируемого окислительного стресса, может быть причиной активации механизмов, направленных на устранение дисбаланса в регуляции внутриклеточного уровня железа в процессе развития резистентности к DOX и имеющих зависимость от типа клеток, что подразумевает особенности внутриклеточной регуляции и особенности деструкции, вызываемой DOX. Поэтому может иметь место либо одновременное снижение экспрессии генов как TfR1, осуществляющего транспорт ионов железа в клетку, так и обеих субъединиц ферритина (клетки K562/DOX), обеспечивающего депонирование ионов железа, либо одновременное повышение их экспрессии, как это наблюдается у клеток MCF-7/DOX, либо как у клеток SKVLB – наряду с повышением экспрессии гена *TFR1* наблюдается только рост экспрессии гена Н-субъединицы ферритина (рис. 6).

Нами выборочно сделана оценка внутриклеточного уровня свободного и связанного железа в результате формирования резистентности к DOX в клетках K562/DOX. Обнаруженное методом ЭПР в клетках K562/DOX снижение как свободного «лабильного» Fe^{2+} железа (g-фактор 2,03), так и связанного Fe^{3+} (g-фактор 4,3) (по всей видимости в виде комплексов с ферритином) (рис. 7) при одновременном росте уровня антиоксидантной ферментативной системы, как это показано выше, может расцениваться как скоординированное адаптивное

изменение в ответ на деструктивное действие, вызываемое АФК и метаболитами (доксорубицином), генерируемыми DOX (Brazzolotto X. et al., 2003) и может рассматриваться как адаптивный механизм снижения поступления железа в клетку, направленный на подавление риска развития Fe²⁺-зависимых деструктивных процессов и снижение уровня окислительного стресса, инициируемого действием роста концентрации DOX в процессе формирования резистентности опухолевых клеток.

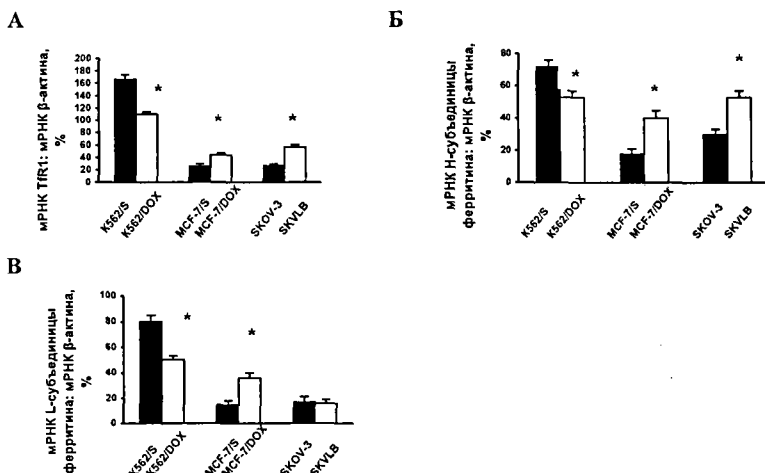


Рис. 6. Влияние формирования резистентности опухолевых клеток к доксорубину на экспрессию генов белков, контролирующих систему транспорта (А – Tgf1) и депонирования (Б и В – Н- и L-субъединицы ферритина, соответственно) железа. Представлено относительное содержание мРНК по отношению к мРНК β-актина (%). n = 4; *p < 0,05.

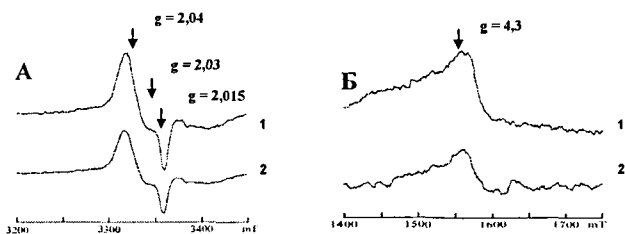


Рис. 7. Спектры ЭПР динитрозильных комплексов негемового железа (А) и спектры ЭПР с сигналом $g = 4,3$ (Б) чувствительных K562/S (1) и резистентных K562/DOX (2) клеток.

Роль транскрипционного фактора Nrf2 в развитии адаптивного антиоксидантного ответа в опухолевых клетках, резистентных к доксорубину

Как было показано выше, развитие резистентности к DOX связано со скоординированным ростом экспрессии целого ряда генов, что приводит к развитию адаптивного антиоксидантного ответа, способного подавлять вызываемый DOX окислительный стресс. Такой эффект скоординированного роста экспрессии генов, в частности, может объясняться активацией редокс-зависимого транскрипционного фактора Nrf2, значительное повышение внутриклеточного содержания которого было установлено в настоящей работе с использованием метода Вестерн блоттинга во всех трех типах резистентных клеток (рис. 8). Среди установленных в настоящее время генов, регулируемых Nrf2 находятся гены антиоксидантных ферментов – Mn-SOD (*SOD2*), каталазы (*CAT*), гемоксигеназы 1 (*HO-1*); гены ферментов, обеспечивающих поддержание внутриклеточного уровня GSH за счет его синтеза *de novo* и восстановления GSSG, – Н и L субъединицы γ -глутамилцистеинсинтетазы (γ -*GCSH*, γ -*GCSL*), γ -глутамилтрансферазы (γ -*Gl*), глутатионредуктазы (*GSR*); гены редокс-зависимых белков – тиоредоксина 1 (*TRX1*), тиоредоксинредуктазы 1 (*TRXRDI*), гены изоформ глутатион S-трансферазы – *GSTP1-1* (*GSTP1*), *GSTA4-4* (*GSTA4*); гены НАД(Ф)Н:хиноноксидоредуктазы 1 (*NQO1*), Н и L-субъединиц ферритина (*H-Ferritin*, *L-Ferritin*) (Дляхович В.В. и др., 2006; Warabi E. Et al., 2007).

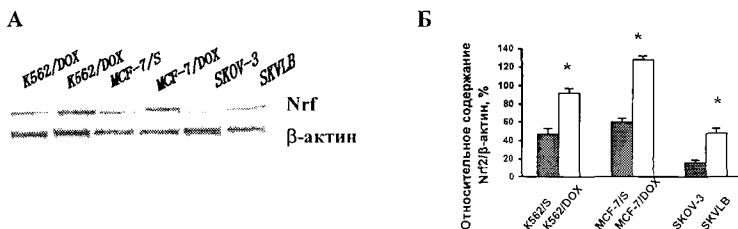


Рис. 8. Влияние формирования резистентности опухолевых клеток к доксорубину на внутриклеточный уровень транскрипционного фактора Nrf2. А – иммуноблот Nrf2. В качестве положительного контроля использован β -актин. Б – оценка уровня Nrf2 по отношению к β -актину (%) с использованием данных денситометрии. n = 4; *p < 0,05.

Экспрессия генов белков семейства Bcl-2 при формировании резистентности опухолевых клеток к доксорубину

У всех трех линий опухолевых клеток формирование резистентности к DOX связана с существенными изменениями экспрессии генов ключевых белков семейства Bcl-2, обладающих антиапоптотическими – белки Bcl-2, Bcl-xl и проапоптотическими свойствами – белок Bax.

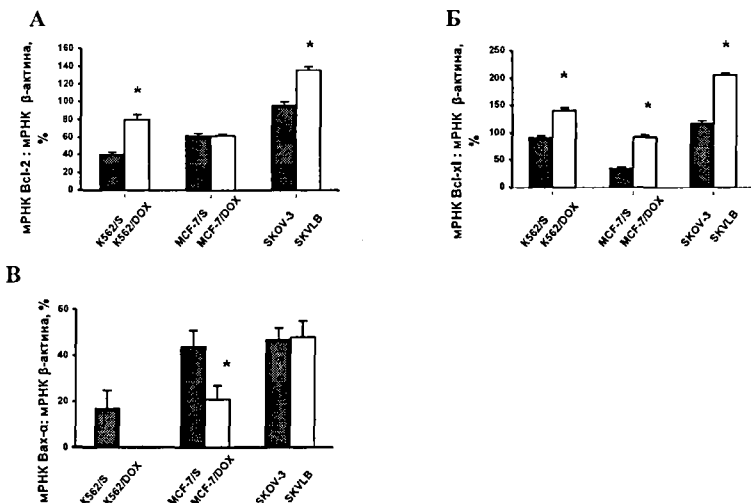


Рис. 9. Влияние формирования резистентности опухолевых клеток к доксорубцину на экспрессию генов белков семейства Bcl-2. Представлено относительное содержание мРНК Bcl-2 (А), Bcl-x1 (Б), Bax-α (В) по отношению к мРНК β-актина (%). n = 4; *p < 0,05.

Максимальное повышение уровня мРНК Bcl-2 наблюдалось в клетках K562/DOX, в меньшей степени – в клетках SKVLB, отсутствие изменения – в клетках MCF-7/DOX (рис. 9, А). Напротив, рост уровня мРНК Bcl-x1 обнаружен у всех трех типов резистентных клеток: максимальный – у MCF-7/DOX клеток и минимальный – у K562/DOX клеток (рис. 9, Б). При оценке внутриклеточного содержания белка Bcl-2 установлен его рост в клетках K562/DOX и SKVLB и, напротив, – снижение в клетках MCF-7/DOX (рис.10, А, В). В последнем случае снижение уровня белка Bcl-2, как полагают (Ogretman P., Safa A., 1996), может объясняться определенным дефектом в механизме трансляции в клетках MCF-7/DOX. В отличие от Bcl-2 рост внутриклеточного уровня Bcl-x1 установлен для всех трех типов резистентных клеток (рис.10, Б, Г), что может свидетельствовать о важной роли сверхпродукции белка Bcl-x1 в формировании устойчивости исследуемых линий клеток к DOX.

В то же время в клетках K562/DOX и MCF-7/DOX обнаружено значительное снижение мРНК Bax-α (рис. 9, В) – одной из сплайсинговых форм мРНК Bax, с трансляцией которой связана активация апоптоза (Wagener C. et al., 1996), что также играет значимую роль в формировании устойчивости опухолевых клеток к DOX. В клетках SKVLB не установлено различий в уровне мРНК Bax-α по сравнению с чувствительными SKOV-3 клетками, что может объясняться обнаруженной в клетках SKOV-3 мутацией в гене *BAX*, вызывающей инактивацию

его проапоптотической активности (Родина А.В. и др., 2005), что приводит к формированию клеток, устойчивых к индукции апоптоза (LeBlanc H. et al., 2002).

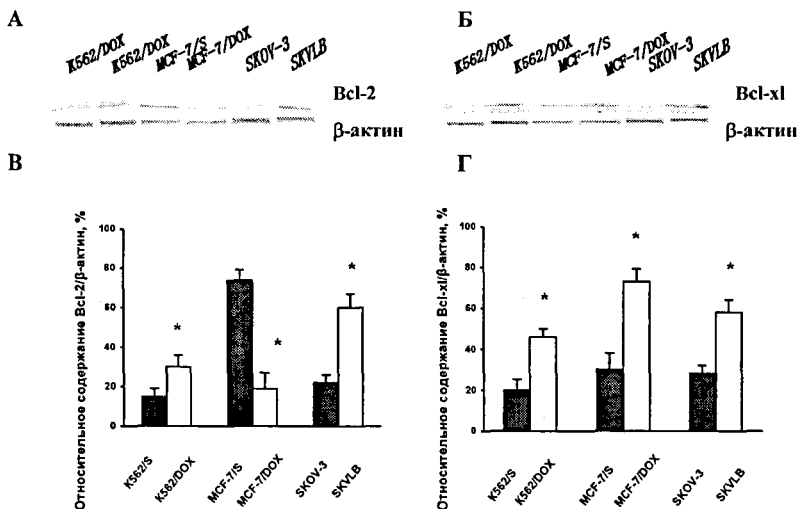


Рис. 10. Влияние формирования резистентности опухолевых клеток к доксорубину на содержание белков Bcl-2 и Bcl-x1. А, Б – иммуноблот Bcl-2 и Bcl-x1, соответственно. В качестве положительного контроля использован β-актин. В, Г – оценка уровня Bcl-2 и Bcl-x1, соответственно, по отношению к β-актину (%) с использованием данных денситометрии. n = 4; *p < 0,05.

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о развитии адаптивного антиоксидантного ответа на окислительный стресс, вызываемый DOX, как важного фактора формирования резистентности клеток эритролейкемии человека K562, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и аденокарциномы яичника SKOV-3 к цитотоксическому действию этого препарата.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГЛУТАТИОНА И РЕДОКС-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ В АНТИОКСИДАНТНОЙ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И ХРОНИЧЕСКИМ ОБСТРУКТИВНЫМ БРОНХИТОМ

Использование антиоксидантной терапии в настоящее время рассматривается как перспективный подход для лечения больных ИБС и хроническим обструктивным бронхитом, так как окислительный стресс является патогенетическим фактором этих заболеваний (Ланкин В.З. и др., 2000; Меньщикова Е.Б.и др., 2008; Соодаева С.К., 2006). Снижение уровня GSH и

антиоксидантных ферментов является одним из ведущих факторов в развитии процессов старения (Меньщикова Е.Б. и др., 2008). В этой связи большой интерес вызывают используемые в антиоксидантной терапии пожилых больных ИБС и хроническим обструктивным бронхитом препараты, которые могут повышать содержание GSH и активировать GSH-зависимые реакции. Продолжая тему, касающуюся роли окислительного стресса и GSH-зависимых реакций при ряде редокс-зависимых заболеваний, эта глава посвящена исследованию роли GSH-зависимой системы и редокс-зависимых белков Txh и Grx в антиоксидантном действии некоторых препаратов, используемых в терапии больных пожилого возраста, страдающих одновременно стабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью, а также пожилых больных хроническим обструктивным бронхитом.

Нами исследованы препараты эмоксипин (Московский эндокринный завод, Россия), мелатонин ("Nature's Bounty, Inc", США), элтацин (ООО "Биотики", Россия) в терапии больных ИБС пожилого возраста и элтацин (ООО "Биотики", Россия) в терапии больных хроническим обструктивным бронхитом аналогичной возрастной группы.

Эмоксипин – 3-окси-6-метил-2-этилпиридин, обладает антиагрегационным, антигипоксическим, ангиопротективным, антиоксидантным действием. Оказывает выраженное кардиопротективное действие (Голиков А.П. и др., 1990).

Мелатонин – синтетический аналог гомона эпифиза, обладает адаптогенным действием. Нормализует циркадные ритмы. Обладает иммуностимулирующими свойствами, предупреждает развитие атеросклероза и новообразований. (Ustundag B., 2000). Обнаружена связь снижения уровня мелатонина с высоким риском возникновения инфаркта миокарда (Sakotnik A. et al., 1999; Girotti L. et al., 2000).

Элтацин – комплекс заменимых аминокислот: глицина, глутаминовой кислоты, цистина – обладает антигипоксическим и антиоксидантным действием. Повышает внутриклеточный уровень GSH. Улучшает антиангинальный, антиишемический эффект при использовании в терапии больных стенокардией II – III функционального класса (Келимбердиева Э.С., 1999).

Сравнительное исследование влияния препаратов эмоксипина, мелатонина, элтацина на содержание GSH и GSSG, соотношение GSH/GSSG, активности антиоксидантных ферментов, глутаредоксина и тиоредоксина у пожилых больных стабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью

Сравнительное исследование действия эмоксипина, мелатонина, элтацина проведено у больных пожилого возраста, страдающих одновременно стабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью (II – III функционального класса по классификации NYHA), в четырех рандомизированных группах.

Таблица 5.

Влияние эмоксипина, элтацина, мелатонина и базисной терапии на содержание GSH, GSSG и соотношение GSH/GSSG в эритроцитах пожилых больных стабильной стенокардией, постинфарктым кардиосклерозом и сердечной недостаточностью.

препарат	GSH мкмоль/г Hb		GSSG нмоль/г Hb		GSH/GSSG	
	до	после	до	после	до	после
эмоксипин n = 21	3,88 ± 0,26	5,66 ± 0,83*	63 ± 11	36 ± 9*	61 ± 16	157 ± 25**
мелатонин n = 21	1,29 ± 0,29	1,31 ± 0,62	55 ± 7	36 ± 6*	23 ± 6	47 ± 10*
элтацин n = 22	2,96 ± 0,38	5,03 ± 0,53*	58 ± 10	29 ± 7*	51 ± 19	173 ± 27**
базисная терапия n = 21	2,12 ± 0,28	2,26 ± 0,33	57 ± 17	44 ± 9	37 ± 7	51 ± 14

*p < 0,05; ** p < 0,01 - достоверность различий с данными до начала каждого курса терапии

Активности антиоксидантных ферментов, Ttx и Grx, содержание GSH и GSSG, соотношение GSH/GSSG оценивали в эритроцитах больных до и после применения (в комплексе с базисной терапией в течение 20 дней) исследуемых препаратов: элтацина (22 больных, 71,6 ± 10,2 лет) в дозе 220 мг три раза в сутки сублингвально; эмоксипина (21 больной, 68,3 ± 3,2 лет) первые 5 дней – однократно по 20 мл 3% раствора внутривенно капельно, в последующие дни – 3 мл 3% раствора двукратно внутримышечно; мелатонина в дозе 3 мг (21 больной, 70,8 ± 9,5 лет) однократно, а также только базисной терапии (21 больной, 71,2 ± 2,4 лет), которая включала нитраты, β-адреноблокаторы, антиагреганты, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, диуретики.

Характерной особенностью действия исследованных препаратов оказалось повышение соотношения GSH/GSSG (таблица 5). Однако причина этого роста зависела от типа препарата. Если в случае эмоксипина и элтацина рост GSH/GSSG был вызван как повышением активности γ-GCS – скорость-лимитирующего фермента синтеза GSH *de novo*, так и активности GR, восстанавливающей GSH из его окисленной формы GSSG (таблица 6), что приводит к росту содержания GSH и снижению уровня GSSG, соответственно, то мелатонин, не оказывая влияния на активность этих ферментов, вызывал повышение соотношения GSH/GSSG, снижая уровень GSSG, по-видимому, за счет способности играть роль «ловушки» свободных радикалов (Reiter R.J. et al., 2003).

Таблица 6.

Влияние эмоксипина, элтацина, мелатонина и базисной терапии на активность γ -глутамилцистеинсинтазы и глутатионредуктазы в эритроцитах пожилых больных стабильной стенокардией, перенесших инфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью

препарат	γ -GCS мкмоль/мин · гНб		GR мкмоль/мин · гНб	
	до	после	до	после
эмоксипин n = 21	1,93 ± 0,34	2,79 ± 0,21*	1,97 ± 0,20	2,80 ± 0,33*
мелатонин n = 21	1,00 ± 0,14	1,04 ± 0,31	1,50 ± 0,54	1,52 ± 0,27
элтацин n = 22	1,64 ± 0,19	2,71 ± 0,38*	2,76 ± 0,24	3,86 ± 0,33*
базисная терапия n = 21	1,32 ± 0,23	1,37 ± 0,45	1,49 ± 0,40	1,53 ± 0,29

*p < 0,05 - достоверность различий с данными до начала каждого курса терапии

Установлено, что использование эмоксипина приводило к повышению активности Cu,Zn-SOD и GPx в эритроцитах, тогда как действие элтацина вызывало рост активности всех анализируемых антиоксидантных ферментов (таблица 7). Напротив, мелатонин в использованной дозе (3 мг/сутки) не оказывал такого эффекта.

Кроме того, действие исследуемых препаратов приводило к редокс-зависимому изменению активностей Grx и Trx: росту активности Grx и, наоборот, снижению активности Trx, что, по-видимому, определяется ростом GSH/GSSG (таблица 8). Рост активности Grx, которая зависит от уровня GSH и активности GR, в значительной степени может определяться ростом соотношения GSH/GSSG, которое характеризует повышение клеточного редокс-статуса и, следовательно, снижение окислительного стресса, являющегося одним из ключевых факторов, способствующих развитию ИБС. Trx, как и Grx, является редокс-зависимым белком из группы тиолдисульфидредуктаз и обладает антиоксидантными свойствами, которые проявляются в способности восстанавливать внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи в белках, в том числе в пероксиредоксинах и глутатионпероксидазах, разлагающих гидроперекиси липидов и H₂O₂, а также в способности непосредственно восстанавливать H₂O₂, GSSG и играть роль "ловушки" ·OH радикалов (Nordberg J., Arner E.S.J., 2001; Das K.C., 2000).

Таблица 7.

Влияние эмоксипина, элтацина, мелатонина и базисной терапии на активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах пожилых больных стабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью

препарат	Cu,Zn-SOD Ед/г Hb		каталаза ммоль/мин · г Hb		GPx мкмоль/мин · г Hb	
	до	после	до	после	до	после
эмоксипин n = 21	133 ± 19	197 ± 28*	9,3 ± 1,0	10,2 ± 1,3	61 ± 16	157 ± 25**
мелатонин n = 21	148 ± 10	152 ± 32	10,0 ± 1,4	10,2 ± 1,6	23 ± 6	47 ± 10*
элтацин n = 22	126 ± 12	187 ± 16*	9,6 ± 1,6	13,5 ± 1,1*	51 ± 19	173 ± 27**
базисная терапия n = 21	122 ± 18	127 ± 11	10,7 ± 1,4	11,0 ± 1,5	37 ± 7	51 ± 14

*p < 0,05, ** p < 0,01 - достоверность различий с данными до начала каждого курса терапии

Таблица 8.

Влияние эмоксипина, элтацина, мелатонина и базисной терапии на активность глутаредоксина и тиоредоксина в эритроцитах пожилых больных стабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью

препарат	Grx мкмоль/мин · гHb		Trx мкмоль/мин · гHb	
	до	после	до	после
эмоксипин n = 21	16,4 ± 1,6	23,8 ± 2,3*	59,5 ± 5,0	37,2 ± 6,8*
мелатонин n = 21	8,5 ± 1,0	11,4 ± 1,1*	46,5 ± 4,1	31,1 ± 3,4*
элтацин n = 22	14,7 ± 1,5	23,5 ± 2,7*	51,1 ± 5,9	28,4 ± 3,7*
базисная терапия n = 21	10,1 ± 1,0	11,2 ± 1,8	48,2 ± 3,4	39,8 ± 5,3

* p < 0,05 - достоверность различий с данными до начала каждого курса терапии

Известно также, что определение активности Trx в эритроцитах и плазме крови может быть использовано для оценки уровня окислительного стресса при ряде заболеваний (Nakamiga H., 2002). В этой связи рост активности Grx и снижение активности Trx может рассматриваться как характеристика подавления уровня окислительного стресса при действии исследуемых препаратов. Наиболее выраженный эффект установлен у элтацина, в меньшей степени – у эмоксипина, минимальный – у мелатонина.

Исследование влияния элтацина на содержание GSH и GSSG, соотношение GSH/GSSG, активности антиоксидантных ферментов, глутаредоксина и тиоредоксина у пожилых больных хроническим обструктивным бронхитом.

Исследование действия элтацина проведено у пожилых больных хроническим обструктивным бронхитом, который входит в группу заболеваний легких, обозначенных как хронические обструктивные болезни легких (ХОБЛ).

Активности антиоксидантных ферментов (Cu,Zn-SOD, каталазы, GPx), Tгx и Gгx, содержание GSH и GSSG, соотношение GSH/GSSG оценивали в эритроцитах больных до и через 16 дней применения элтацина комплексно с базисной терапией (14 больных, 67,7 ± 3,2 лет) в дозе 220 мг три раза в сутки сублингвально, а также только базисной терапии (14 больных, 66,4 ± 4,8 лет), которая включала эуфиллин, антибиотики, муколитические препараты.

Таблица 9.

Влияние элтацина и базисной терапии на содержание GSH, GSSG и соотношение GSH/GSSG в эритроцитах пожилых больных хроническим обструктивным бронхитом.

препарат	GSH мкмоль/г Hb		GSSG нмоль/г Hb		GSH/GSSG	
	до	после	до	после	до	после
элтацин n = 22	1,27 ± 0,21	2,06 ± 0,28*	67 ± 9	42 ± 5*	19 ± 7	49 ± 8*
базисная терапия n = 21	1,32 ± 0,19	1,39 ± 0,30	61 ± 8	44 ± 6	22 ± 4	30 ± 6

*p < 0,05- достоверность различий с данными до начала каждого курса терапии

Установлено, что использование элтацина комплексно с базисной терапией приводило к заметному повышению содержания GSH и снижению уровня GSSG, что вызывало рост соотношения GSH/GSSG в эритроцитах больных (таблица 9). Одновременно наблюдался рост активности антиоксидантных ферментов – Cu,Zn-SOD, каталазы и GPx (таблица 10). Напротив, при действии одной базисной терапии не установлено изменения уровня GSH и активности антиоксидантных ферментов (таблица 9, 10), однако отмечена тенденция (p > 0,05) к снижению уровня GSSG и росту соотношения GSH/GSSG, что может отражать положительный эффект проводимой противовоспалительной терапии.

Таблица 10.

Влияние элтации и базисной терапии на активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах пожилых больных хроническим обструктивным бронхитом.

препарат	Cu,Zn-SOD Ед/г Hb		каталаза ммоль/мин · г Hb		GPx мкмоль/мин · г Hb	
	до	после	до	после	до	после
элтацин n = 22	168 ± 12	243 ± 16*	9,1 ± 1,2	12,8 ± 0,9*	16,5 ± 2,7	26,4 ± 1,9*
базисная терапия n = 21	148 ± 15	159 ± 21	10,8 ± 1,7	10,6 ± 1,5	14,7 ± 2,5	15,6 ± 3,4

* p < 0,05 - достоверность различий с данными до начала каждого курса терапии

Рост соотношения GSH/GSSG при действии элтации (комплекс заменимых аминокислот глицина, глутаминовой кислоты, цистина – предшественников GSH, так как в клетке цистин легко превращается в цистеин (Sadowska A.M et al., 2007)) является результатом активации синтеза GSH и его ресинтеза из GSSG вследствие повышения активности γ -GCS и GR, соответственно (таблица 11).

Таблица 11.

Влияние элтации и базисной терапии на активность γ -глутамилцистеинсинтетазы и глутатионредуктазы в эритроцитах пожилых больных хроническим обструктивным бронхитом

препарат	γ -GCS мкмоль/мин · гHb		GR мкмоль/мин · гHb	
	до	после	до	после
элтацин n = 14	1,26 ± 0,14	1,94 ± 0,17*	2,11 ± 0,18	3,16 ± 0,27*
базисная терапия n = 14	1,15 ± 0,16	1,18 ± 0,25	2,38 ± 0,24	2,15 ± 0,35

*p < 0,05 - достоверность различий с данными до начала каждого курса терапии

Следует отметить, что повышение внутриклеточного уровня GSH может подавлять активацию транскрипционного фактора NF-kB (Peristeris P. et al., 1992; Watchorn T. et al., 1998; Parmentier M. et al., 1999), вызывая снижение образования про-воспалительных цитокинов, в том числе IL-1, IL-8, TNF- α , инициирующих рост продукции АФК и развитие процессов воспаления.

Известно, что прогрессия хронических обструктивных болезней легких приводит к подавлению антиоксидантной системы, прежде всего за счет супрессии гена каталитической γ -GCSH субъединицы γ -GCS и снижения внутриклеточного уровня GSH (Behr J. et al., 2002; Kinnula V.L., 2005), а также за счет снижения экспрессии генов GSH-зависимых ферментов, в том числе гена цитозольной изоформы глутаредоксина – Grx1 (Peltoniemi M.J., 2006)

Напротив, использование элтацина вызывает рост соотношения GSH/GSSG, что, по-видимому, в значительной степени определяет рост активности Grx и, наоборот, снижение активности Trx (таблица 12). Последний факт, вероятно, может определяться также большей востребованностью Grx в условиях снижения окислительного стресса для восстановления функциональной активности белков путем восстановления их смешанных дисульфидов с GSH, по отношению к которым Grx в отличие от Trx обладает высокой специфичностью (Fernandes A.P., Holmgren A., 2004).

Таким образом, использование элтацина в терапии больных хроническим обструктивным бронхитом приводит к росту антиоксидантного статуса эритроцитов, что сопровождается ростом внутриклеточного содержания GSH, соотношения GSH/GSSG, активности антиоксидантных ферментов и редокс-зависимым изменением соотношения Grx и Trx – ростом активности Grx и снижением активности Trx.

Таблица 12.

Влияние элтацина и базисной терапии на активность глутаредоксина и тиоредоксина в эритроцитах пожилых больных хроническим обструктивным бронхитом

препарат	Grx мкмоль/мин · гHb		Trx мкмоль/мин · гHb	
	до	после	до	после
элтацин n = 14	11,3 ± 1,1	17,5 ± 1,6*	65,8 ± 6,1	40,2 ± 4,3*
базисная терапия n = 14	14,1 ± 1,7	17,4 ± 1,1	57,2 ± 8,4	48,9 ± 5,1

* $p < 0,05$ - достоверность различий с данными до начала каждого курса терапии

Результаты, представленные в настоящей работе, свидетельствуют о важной роли глутатион-зависимых процессов как в развитии адаптивного антиоксидантного ответа на прооксидантное действие доксирубина в резистентных опухолевых клетках, так и в антиоксидантном действии препаратов эмоксилина, элтацина, мелатонина у пожилых больных стабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью, а также у пожилых больных хроническим обструктивным бронхитом.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружена связь формирования резистентности клеток эритролейкемии человека K562, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и аденокарциномы яичника SKOV-3 к обладающему прооксидантным действием доксорубину с развитием адаптивного антиоксидантного ответа, что выражается в скоординированном изменении экспрессии генов антиоксидантных ферментов и ферментов, контролирующих внутриклеточный уровень глутатиона, а также генов белков глутаредоксин- и тиоредоксин-зависимых систем, пероксиредоксинов, белков транспорта и депонирования железа, ключевых ферментов, катализирующих одно- и двухэлектронное восстановление доксорубина. Характер развития адаптивного антиоксидантного ответа зависит от типа резистентных клеток.

2. Установлен рост экспрессии генов ферментов, контролирующих синтез глутатиона (γ -глутамилцистеинсинтетазы, глутатионсинтетазы, γ -глутамилтрансферазы) и его восстановление из окисленной формы GSSG (глутатионредуктазы), а также генов глутатион-зависимых ферментов (глутатионпероксидазы, глутатионS-трансферазы) в резистентных к доксорубину клетках K562/DOX, MCF-7/DOX, SKVLB.

3. Установлен рост экспрессии генов глутатион-зависимых редокс-белков глутаредоксина 1, глутаредоксина 2 и пероксиредоксина 6 в резистентных к доксорубину опухолевых клетках.

4. На примере клеток K562/DOX показано, что изменение соотношения экспрессии генов НАДФН-цитохром-P-450 редуктазы и НАД(Ф)Н:хиноноксидоредуктазы 1, а также экспрессии генов, контролирующих транспорт (трансферриновый рецептор 1) и депонирование ионов железа (H- и L-субъединицы ферритина), приводит к уменьшению внутриклеточного уровня железа (как свободного, так и связанного) и снижению образования активных форм кислорода.

5. Установлена прямая связь между ростом внутриклеточного уровня транскрипционного фактора Nrf2 и развитием антиоксидантного ответа на прооксидантное действие доксорубина в резистентных клетках K562/DOX, MCF-7/DOX, SKVLB.

6. Показано, что развитие резистентности опухолевых клеток к доксорубину связано с ростом экспрессии гена *BCL-2* и снижением уровня мРНК Вах- α в клетках K562/DOX и SKVLB, а также с повышением уровня мРНК Bcl-xl в клетках K562/DOX, MCF-7/DOX, SKVLB.

7. Установлено, что применение препаратов эмоксипина, элтацина, мелатонина в терапии пожилых больных стабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью вызывает повышение клеточного редокс-статуса эритроцитов, характеризуемого ростом соотношения GSH/GSSG, а также изменение активности редокс-зависимых белков

– рост активности глутаредоксина и снижение активности тиоредоксина. Рост соотношения GSH/GSSG при действии эмоксипина и элтацина связан с их индуцирующим влиянием на ферменты синтеза глутатиона и его восстановления из окисленной формы.

8. Применение препарата элтацина в терапии пожилых больных хроническим обструктивным бронхитом приводит к росту антиоксидантного статуса эритроцитов, что сопровождается повышением внутриклеточного содержания GSH, соотношения GSH/GSSG, активности антиоксидантных ферментов (Cu,Zn-супероксиддисмутаза, каталазы, глутатионпероксидазы) и редокс-зависимым изменением соотношения активностей глутаредоксина и тиоредоксина.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Саприн А.Н., Калинина Е.В., Бабенко М.Д. Биохимические механизмы развития и регуляции мультилекарственной резистентности раковых клеток. // Успехи биол. химии.– 1996.– Т. 36.– С.213-265.
2. Саприн А.Н., Калинина Е.В. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов. // Успехи биол. химии.– 1999.– Т. 39.– С. 289-326.
3. Калинина Е.В., Новичкова М.Д., Чиркова Е.М., Коппель М.А., Комиссарова И.А. Повышение радиорезистентности организма при действии метаболитического препарата МР-33. // Радиц. биология. Радиоэкология.– 1999.– Т.39, № 2-3.– С. 272-276.
5. Калинина Е.В., Новичкова М.Д., Комиссарова И.А. Метаболический препарат МР-33 – индуктор внутриклеточного уровня глутатиона и глутатионзависимых ферментов. // Бюл. экспер. биол. мед.– 1999.– Т.128, № 7.– С. 56-59.
6. Заславская Р.М., Келимбердиева Э.С., Тейблом М.М., Комиссарова И.А., Калинина Е.В. Оценка эффективности метаболической терапии комплексом аминокислот у больных ишемической болезнью сердца пожилого возраста. //Клин. мед.– 1999.– Т.77, № 4.– С. 39-42.
7. Калинина Е.В., Комиссарова И.А., Заславская Р.М., Новичкова М.Д., Келимбердиева Э.С. Влияние метаболической терапии на внутриклеточный уровень антиоксидантной системы больных ишемической болезнью сердца пожилого возраста. // Клин. мед.– 2000.– Т.78, № 1.– С. 40-43.
8. Заславская Р.М., Калинина Е.В., Комиссарова И.А., Келимбердиева Э.С., Тейблом М.М. Связь показателей гемодинамики и параметров редокс статуса эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца пожилого возраста // Клин. мед.– 2000.– Т.78, № 7.– С. 46-49.
9. Калинина Е.В., Новичкова М.Д., Щербак Н.П., Саприн А.Н. Ингибирующее действие прогестерона на глутатионS-трансферазу P1-1 и его антипролиферативный эффект на клетки линии K562 эритролейкемии человека. // Вопр. онкол.– 2000.– Т.46, № 1.– С. 68-73.

10. Kalinina E.V., Novichkova M.D., Scherbak N.P., Solomka V.S., Saprin A.N. GSH-dependent redox regulation and antioxidant enzymes in the formation of resistance to doxorubicin in K562 erythroleukemia cells. // Adv. Exp. Med. Biol.– 2001.– V.500.– P. 241-244.
11. Калинина Е.В., Саприн А.Н., Соломка В.С., Щербак Н.П., Черных Н.С., Пирузян Л.А. Роль антиоксидантной системы и редокс-зависимой регуляции Bcl-2 в формировании резистентности клеток K562 эритролейкемии человека к доксорубину. // Вопр. онкол.– 2001.– Т.47, № 5.– С. 595-600.
12. Калинина Е.В., Саприн А.Н., Соломка В.С., Щербак Н.П., Пирузян Л.А. Подавление образования перекиси водорода, супероксид аниона и семихинонных радикалов в ходе формирования резистентности клеток K562 эритролейкемии человека к доксорубину. // Вопр. онкол.– 2003.– Т.49, № 3.– С.294-298.
13. Заславская Р.М., Лилица Г.В., Калинина Е.В., Акзамова Р.Т., Тейблэм М.М. Коррекция метаболических нарушений мелатонином у пожилых больных постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью. //Российский мед. журнал.– 2004.– № 2.– С. 41-42.
14. Заславская Р.М., Лилица Г.В., Калинина Е.В. Эффективность эмоксипина в комплексном лечении пожилых больных постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью. // Клин. мед.– 2004.– Т.82, № 12.– С. 19-21.
15. Лилица Г.В., Заславская Р.М., Калинина Е.В. Эффективность метаболических препаратов в комплексном лечении пожилых больных постинфарктным кардиосклерозом и недостаточностью кровообращения. // Клин. мед.– 2005.– Т.83, № 3.– С. 54-57.
16. Саприн А.Н., Калинина Е.В., Сереженков В.А., Котова Я.Н., Соломка В.С., Щербак Н.П. Изменение свободнорадикального состояния и уровня свободного железа при формировании лекарственной резистентности опухолевых клеток. //Биофизика.– 2006.– Т.51, № 3.– С. 485-490.
17. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Саприн А.Н., Котова Я.Н., Андреев Я.А, Соломка В.С., Щербак Н.П. Изменение экспрессии генов антиоксидантных ферментов, гемоксигеназы-1, bcl-2, bcl-x, и уровня активных форм кислорода при формировании резистентности опухолевых клеток к доксорубину. //Биохимия.– 2006.– Т.71, № 11.– С. 1479-1487.
18. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Саприн А.Н., Котова Я.Н., Ремизов В.И., Щербак Н.П. Экспрессия генов редоксзависимых изоформ глутатион S-трансферазы GSTP1-1 и GSTA4-4 при развитии резистентности опухолевых клеток к доксорубину. // Бюл. экспер. биол. мед.– 2007.– Т.143, № 3.– С. 298-301.
19. Сереженков В.А., Калинина Е.В., Глазунова В.А., Саприн А.Н., Ванин А.Ф. Почему железо устраняет токсическое действие S-нитрозотиолов на культуру клеток животных и человека. // Биофизика.– 2007.– Т. 52 № 5.– С. 869-875.
20. Заславская Р.М., Лилица Г.В., Калинина Е.В., Комиссарова И.А., Максимова Л.Н. Влияние метаболического препарата элтацин на клинические, функциональные и биохимические показатели у больных хронической

сердечной недостаточностью. // Рациональная фармакотер. кардиол.– 2007.– № 1.– С. 33-36.

21. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Саприн А.Н., Котова Я.Н., Гаврилова Ю.А., Черных Н.С., Щербак Н.П. Экспрессия генов тиоредоксина 1 и тиоредоксина 2 в клетках карциномы яичника SKVLB с мультитекарственной резистентностью. // Бюл. экспер. биол. мед.– 2007.– Т.143, № 9.– С. 274-276.
22. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Саприн А.Н. Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редоксзависимых процессах. // Успехи биол. химии.– 2008.– Т. 48.– С. 319-358

Патент:

23. Патент на изобретение № 2096034 «Фармацевтическая композиция, индуцирующая биосинтез глутатиона, активность глутатионтрансферазы и оказывающая антиоксидантное, радиопротекторное и антигипоксическое действие, способы лечения, профилактики и защиты с ее использованием», зарегистрированный 20 ноября 1997 г., г. Москва. Авторы изобретения: Комиссарова И.А., Калинина Е.В., Гудкова Ю.В., Бурбенская Н.М., Солдатенкова Т.Д., Кондрашова Т.Т., Чиркова Е.М., Коппель М.А., Корнеев А.А., Нарциссов Я.Р.

Публикации в научных журналах, сборниках статей, материалах конференций:

24. Калинина Е.В., Бабенко М.Д., Комиссарова И.А. Антиоксидантные и радиопротекторные свойства аминокислотной композиции – индуктора глутатион-конъюгирующей системы. // Доклады II Российского национального конгресса “Человек и лекарство”, 10-15 апреля, Москва.– 1995.– С.15.
25. Kalinina E.V., Saprin A.N. Inhibition of glutathione S- transferase P1-1 from human placenta by some steroid hormones. // Proceedings of International ISSX-Workshop on Glutathione S-transferases, Noordwijkerhout, The Netherlands, April 22-25.– 1995.– P.39.
26. Kalinina E.V. Inhibition of glutathione S-transferase P1-1 and proliferation of K562 human erythroleukemia cells by some steroids. // Proceedings of 7th North American ISSX Meeting, October 20-24, San Diego, USA.– 1996.– P.418.
27. Kalinina E.V., Saprin A.N. Modulation of glutathione and glutathione-linked enzymes by some endogenous factors. // Proceedings of International Conference on Glutathione and Glutathione-Linked Enzymes in Human Cancer and Other Diseases, October 31- November 3, Hilton Head, USA.– 1996.– P.33.
28. Калинина Е.В., Саприн А.Н., Бабенко М.Д., Щербак Н.П. Фармакомодуляция некоторых факторов мультитекарственной резистентности раковых клеток. //Труды I съезда онкологов стран СНГ 3-7 декабря, Москва.– 1996.– Т.1.– С. 53.
29. Kalinina E.V., Saprin A.N. Role of glutathione S-transferase P1-1 in proliferation and resistance to doxorubicin of human erythroleukemia K562 cells. // Proceedings of International Society for the Study of Xenobiotics, 6th European ISSX Meeting, June

- 30-July 3, Gothenburg, Sweden.– 1997.– P.41.
30. Kalinina E.V., Babenko M.D. Relationship between down-regulation of glutathione S-transferase P1-1 and reversion of drug resistance in human erythroleukemia K562/DOX cells. // Abstracts of International Workshop on Glutathione Transferases, November 7-10, Rome, Italy.– 1997.– P. 56.
 31. Калинина Е.В., Новичкова М.Д., Комиссарова И.А. Индукция эндогенной антиоксидантной системы метаболическим препаратом МР-33. // Доклады 5 Международной конференции “Биоантиоксидант“, 18-20 ноября, Москва.– 1998.– С. 218.
 32. Kalinina E.V., Novichkova M.D. Role of mediation of glutathione-dependent redox status in the formation and reversion of resistance to doxorubicin in erythroleukemia cells. // Proceedings of 7th European ISSX Meeting, August 22-26, Budapest, Hungary.– 1999.– P. 45.
 33. Калинина Е.В., Заславская Р.М., Келимбердиева Э.С., Жданов Ю.А., Теуш Б.Л. Сравнительная оценка эффективности метаболической терапии комплексом аминокислот (глутаминовой кислоты, глицина, цистенна) и предуктала больных ишемической болезнью сердца пожилого возраста. // Клини. геронтология.– 2000.– С. 52-53.
 34. Kalinina E.V., Saprin A.N. Role of GSH-related system in individual sensitivity to the risk of a rise of ischemic heart disease. // Drug Metab. Rev.– 2001.– Vol. 33 (1)– P.228.
 35. Kalinina E.V., Saprin A.N., Novichkova M.D. Role of GSTP1-1 in the formation of antioxidant response during the development of drug resistance of cancer cells. //Chem.-Biol. Interact.– 2001.– Vol.153, N. 1-3.– P. 118-119.
 36. Калинина Е.В., Сапрын А.Н., Соломка В.С., Щербак Н.П., Черных Н.С., Пирузян Л.А. Роль антиоксидантного статуса и редокс-зависимой регуляции клеток K562 эритролейкемии человека к доксорубину. // Доклады Национальной конференции “Свободные радикалы, антиоксиданты и болезни человека”, 19-22 сентября, Смоленск.– 2001.– С. 277-278.
 37. Kalinina E.V. Role GSTP1-1 in the prediction of rise and development of ROS-dependent chronic obstructive inflammatory diseases in lung. // Chem.-Biol. Interact.– 2001.– Vol.153, N. 1-3.– P. 116-117.
 38. Калинина Е.В., Соломка В.С., Щербак Н.П., Черных Н.С., Сапрын А.Н. Рост антиоксидантного статуса клеток эритролейкемии K562 в процессе формирования резистентности к доксорубину. // Тезисы 6 Международной конференции “Биоантиоксидант”, 16-19 апреля, Москва.– 2002.– С. 544-545.
 39. Zaslavskaya R.M., Kelimberdieva E., Kalinina E.V., Dilmagambetova G. Influence of metabolic therapy with aminoacids and preductal on extrasystolia for ischemic heart disease patients. // Abstracts of 6th International Dead Sea Symposium on Cardiac Arrhythmias and Device Therapy, March 5-7, Tel Aviv, Israel.– 2002.– P.40.
 40. Zaslavskaya R.M., Lilitza G.V., Kalinina E.V. Influence of melatonin upon redox status in erythrocytes of IHD old patients. // Cardiovascular drug and therapy.– 2002. – Vol. 16(1)– P. 38-39.

41. Kalinina E.V., Solomka V.S., Saprin A.N. Redox-dependent changes of cellular signaling during development of resistance of human erythroleukemia K562/DOX cells. // Free Radical.Biol.Med.– 2002.– Vol. 33, suppl. 1.– P. 67.
42. Zaslavskaya R.M., Lilitza G.V., Kalinina E.V., Dilmagambetova G., Goncharov L. Antioxidant action of combined therapy with trimetazidin and aminoacids in ischemic heart disease of old patients. // Atherosclerosis.– 2002.– Vol.3, N 2.– P. 242.
43. Заславская Р.М., Лилица Г.В., Калинина Е.В., Гончаров Л.Ф. Влияние мелатонина на перекисное окисление липидов в эритроцитах больных пожилого возраста с ишемической болезнью сердца. // Клинические исследования лекарственных средств в России.– 2002.– С. 38-41
44. Калинина Е.В., Соломка В.С., Щербак Н.П., Черных Н.С., Сапριν А.Н. Пост антиоксидантного статуса клеток эритролейкемии K562 в процессе формирования резистентности к доксорубину. // Тезисы 6 Международной конференции “Биоантиоксидант”, 16-19 апреля, Москва.– 2002.– С.544-545.
45. Kalinina E.V., Solomka V.S., Saprin A.N. Redox-dependent changes of cellular signaling during development of resistance of human erythroleukemia K562/DOX cells. // Free Radical.Biol.Med.– 2002.– Vol. 33, suppl.1.– P.67.
46. Калинина Е.В., Соломка В.С., Сереженков В.А., Сапριν А.Н. Роль редокс-зависимых процессов в формировании лекарственной резистентности клеток эритролейкемии человека K562. // Вопросы гематологии-онкологии в педиатрии.– 2002.– Т. 1, № 2.– С. 99.
47. Kalinina E.V., Saprin A.N., Solomka V.S., Scherbak N.P. A rise of adaptive antioxidant response and changes of redox-dependent signaling during development of K562/DOX cells resistance to doxorubicin. // Abstracts of Int. Simposium “ROS and Nitrogen Species”, July 8-12, Sant-Petersburg.– 2002.– P.153.
48. Kalinina E.V., Saprin A.N., Solomka V.S., Scherbak N.P., Serezhenkov V.A., Pyruzyan L.A. Suppression of H₂O₂, O₂⁻ and semiquinone free radicals production in human erythroleukemia K562 cells during development of resistance to doxorubicin. // Drug Metab. Rev.– 2003.– Vol. 35, suppl.1.– P. 137.
49. Zaslavskaya R.M., Dilmagambetova G., Kalinina E.V., Lilitza G.V. Correction of the rate in episodes of myocardial ischemia and disturbance in cardiac rhythms with altizem and their metabolic control in ischemic heart disease. // J. Coronary Artery Disease.– 2003.– Vol. 5, N.1.– P. 22.
50. Калинина Е.В., Комиссарова И.А., Заславская И.А. Изменение свободнорадикального окисления, активностей редокс-зависимых мессенджеров и уровня трансферрина у больных хроническим обструктивным бронхитом при действии метаболитического препарата элтацин. // Пульмонология (13 Национальный конгресс по болезням органов дыхания).– 2003, приложение.– С.252.
51. Калинина Е.В., Комиссарова И.А., Заславская Р.М., Лилица Г.В., Жданов Ю.А., Новичкова М.Д. Влияние метаболитического препарата элтацин на антиоксидантный уровень больных ИБС пожилого возраста. //Клин.геронтология.– 2003.– Т.9, № 9.– С. 9.

52. Калинина Е.В., Соломка В.С., Сереженков В.А., Саприн А.Н., Новиков К.Н., Чермных Н.С. Роль свободнорадикальных процессов в формировании резистентности клеток K562 эритролейкемии человека к доксорубину. //Материалы научно-практической конференции “Медико-биологические науки для теоретической и клинической медицины” 20-21 ноября, Москва.– 2003.– С. 87.
53. Калинина Е.В., Комиссарова И.А., Заславская Р.М., Лилица Г.В., Новичкова М.Д. Влияние элтацина, эмоксипина и мелатонина на антиоксидантный статус больных постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью пожилого возраста. // Доклады XI Российского Национального конгресса “Человек и лекарство”, 19-23 апреля, Москва.– 2004.– С.180.
54. Калинина Е.В., Заславская Р.М., Лилица Г.В., Векленко Г.В. Модуляция антиоксидантного статуса пожилых больных хроническим бронхитом //Клин.геронтология.– 2004.– Т.10, № 9.– С. 10.
55. Kalinina E.V., Komissarova I.A., Zaslavskaya R.M. Eltacin – metabolic drug with antioxidant properties. // Abstract of 19th European Workshop on Drug Metabolism, October 3-8 Antalya, Turkey.– 2004.– P.90.
56. Zaslavskaya R.M., Lilita G.V., Kalinina E.V. Efficacy of metabolic drugs in complex therapy of old patients with postinfarctional and cardiosclerosis heart failure. // Abstracts of Workshop of European Society of Cardiology “Acute of Cardiac Care 2004”, October 17-20, Rome, Italy.– 2004.– P. 59.
57. Калинина Е.В., Соломка В.С., Чермных Н.С., Сереженков В.А., Новиков К.Н., Саприн А.Н. Роль свободнорадикальных процессов в формировании резистентности опухолевых клеток к доксорубину. // Материалы III Съезда биофизики России 24-29 июля, Воронеж.– 2004.– С. 47.
58. Калинина Е.В., Соломка В.С., Сереженков В.А., Саприн А.Н. Изменение соотношения ферментов редокс-активации доксорубина, снижения генерации АФК и внутриклеточного уровня железа в процессе развития лекарственной резистентности клеток K562 эритролейкемии человека. // Вопросы гематологии-онкологии и иммунопатологии в педиатрии.– 2004.– Т.3, №4.– С. 88.
59. Kalinina E.V., Komissarova I.A., Zaslavskaya R.M., Lilita G.V. Antioxidative effect of metabolic drug eltacin and its use in combined therapy of aging patients with ischemic heart disease. // Eur. J. Clin. Invest.– 2004.– Vol. 34, supp.1.– P.27.
60. Kalinina E.V., Komissarova I.A., Zaslavskaya R.M., Lilita G.V., Novichkova M.D. Redox-regulation of antioxidant postinfarct state of aging patients with postinfarct cardiosclerosis under melatonin, emoxipin and eltacin treatment. // Drug Met. Rev.– 2004.– Vol. 36, supp.1.– P. 219.
61. Kalinina E.V., Saprin A.N., Solomka V.S., Serezhenkov V.A., Terekhov S.M. Decrease of iron level as well as production of semiquinone free radicals, superoxide anion radicals and H₂O₂ in human erythroleukemia cells upon development of resistance to doxorubicin. // Eur.J.Clin.Invest.– 2004.– Vol. 34, suppl1.– P. 20-21.
62. Kalinina E.V., Chernov N.N., Saprin A.N. Alteration of cellular redox-dependent signaling under development of K562 cells resistance to doxorubicin. // Amino Acids.

- The Forum Amino Acids And Protein Research.– 2005.– Vol. 9, N.1.– P. 5.
63. Калинина Е.В., Саприн А.Н., Чернов Н.Н., Андреев Я.А., Черных Н.С., Соломка В.С., Щербак Н.П. Изменение экспрессии генов *bcl-2*, *bcl-x* и уровня образования АФК в процессе развития резистентности к доxorубину в клетках K562, MCF-7 и SKOV-3. // Материалы 4 Национальной научно-практической конференции “Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека”, 19-22 сентября, Смоленск.– 2005.– С. 40.
 64. Kalinina E.V., Saprin A.N., Serezhenkov V.A., Scherbak N.P., Solomka V.S., Gavrilova U.A. Suppression of NADH dehydrogenase activity and semiquinone free radicals level as well as ROS production in human erythroleukemia K562 cells upon development of resistance to doxorubicin. // Eur. J. Clin. Invest.– 2005.– 35 suppl.2.– P. 25.
 65. Kalinina E.V., Saprin A.N., Scherbak N.P., Solomka V.S., Gavrilova U.A. Regulation of *bcl-2*, *bcl-x* and *bax* genes expression and ROS production under development of drug resistance in cancer cells. // Free Radic. Res.– 2005.– Vol. 39, suppl.1.– P. 38.
 66. Калинина Е.В., Комиссарова И.А., Заславская Р.М., Лилица Г.В., Новичкова М.Д. Влияние эмоксипина, элтацина и мелатонина на тиоредоксин- и глутаредоксин-зависимые связи у больных постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью пожилого возраста. // Доклады VII Международной конференции “Биоантиоксидант”, 25-26 октября, Москва.– 2005.– С. 147-148.
 67. Kalinina E.V., Komissarova I.A., Zaslavskaya R.M., Kelimberdieva E., Lilita G.V., Zhdanov U. Antioxidative and antiarrhythmical effects of a new metabolic drug eltacin and its use in combined therapy with trimetazidine. // Pacing and Clinical Electrophysiology.– 2006.– Vol. 29, suppl.1.– P. 60.
 68. Kalinina E.V., Chernov N.N., Kotova Ya.N., Saprin A.N. Thioredoxin and glutaredoxin expression as well as alteration of cellular ROS level under development of cancer cells resistance to doxorubicin // Abstract of 7th Conference of Biological Reactive Intermediates, Human Health and Diseases, January 4-7, Tucson, Arizona, USA.– 2006. – P. 67.
 69. Kalinina E.V., Chernov N.N., Saprin A.N. Alteration of ROS production as well as Bcl-2 and Bcl-xl expression under development of cancer cells resistance. // Biochim. Biophys. Acta.– 2006.– Vol. 14.– P. 466.
 70. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Саприн А.Н. Экспрессия генов антиоксидантных ферментов, Bcl-2, Bcl-x и изменение уровня образования активных форм кислорода в процессе развития резистентности опухолевых клеток к доxorубину. // Доклады 14 Международной конференции и дискуссионного научного клуба “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии”, 31 мая-9 июня, Москва.– 2006.– С. 412-413.
 71. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Саприн А.Н., Черных Н.С., Ремизов В.И., Щербак Н.П. Роль тиоредоксина и глутаредоксина в развитии адаптивного антиоксидантного ответа в резистентных опухолевых клетках // Материалы 5 национальной научно-практической конференции “Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека”, 18-22 сентября, Смоленск.–

- 2006.– С. 287-288.
72. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Саприн А.Н., Черных Н.С., Ремизов В.И., Щербак Н.П. Экспрессия генов изоформ глутатионтрансферазы GSTP1-1, GSTA4-4 и рост антиоксидантной защиты в опухолевых клетках, резистентных к доксорубину // Материалы 5 национальной научно-практической конференции “Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека”, 18-22 сентября, Смоленск.– 2006.– С. 285-286.
 73. Калинина Е.В., Заславская Р.М., Новичкова М.Д., Комисарова И.А. Антиоксидантный эффект элтацина в терапии больных ИБС пожилого возраста // Сборник научно-практических работ сотрудников городской клинической больницы № 60, посвященный 50-летию юбилею клиники.– М.: Оверлей, 2007.– С.118-120.
 74. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Саприн А.Н. Экспрессия генов изоформ тиоредоксина и редокс-зависимых изоформ глутатионтрансферазы при формировании резистентности опухолевых клеток к доксорубину. // Доклады 15 Международной конференции и дискуссионного научного клуба “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии”, 31 мая-9 июня, Москва.– 2007.– С. 396-398.
 75. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д., Саприн А.Н. Изменение экспрессии генов изоформ глутатионпероксидазы GPx1, GPx4 и пероксиредоксина 6 при формировании резистентности опухолевых клеток к доксорубину. // Доклады 4 Крымской конференции “Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии”, 31 мая-9 июня, Судак, Крым, Украина.– 2008.– С. 21.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК** – активные формы кислорода
DOX – доксорубин (doxorubicin)
γ-GCS – γ-глутамилцистеинсинтетаза (γ-glutamylcysteine synthetase)
γ-GCSII – каталитическая субъединица γ-глутамилцистеинсинтетазы
γ-GCSL – регуляторная субъединица γ-глутамилцистеинсинтетазы
GPx – глутатионпероксидаза (glutathione peroxidase)
GR – глутатионредуктаза (glutathione reductase)
Grx – глутаредоксин (glutaredoxin)
GSH, GSSG – глутатион восстановленный, окисленный
GST – глутатионтрансфераза (glutathione S-transferase)
GS – глутатионсинтетаза (glutathione synthetase)
γ-GT – γ-глутамилтрансфераза (γ-glutamyltransferase)
Cu, Zn-SOD - Cu, Zn-супероксиддисмутаза (Cu, Zn-superoxide dismutase)
HO-1 – гемоксигеназа 1 (heme oxygenase 1)
Mn-SOD – Mn-супероксиддисмутаза (Mn-superoxide dismutase)
Nrf2 – NF-E2-зависимый фактор 2 (NF-E2-related factor 2)
NQO1 – НАД(Ф)Н:хиноноксидоредуктаза 1 (NAD(P)H:quinone oxidoreductase1)
Prx – пероксиредоксин (peroxiredoxin)
TfR – рецептор трансферрина 1 (transferrin receptor 1)
Trx – тиоредоксин (thioredoxin)
TrxR – тиоредоксин редуктаза (thioredoxin reductase)

КАЛИНИНА ЕЛЕНА ВАЛЕНТИНОВНА (РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ)

**РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ГЛУТАТИОН-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ
В РАЗВИТИИ КЛЕТОЧНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ И ПРИ
ТЕРАПИИ РЯДА ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Работа посвящена исследованию основных биохимических механизмов развития адаптивного антиоксидантного ответа при формировании лекарственной устойчивости опухолевых клеток, а также изучение роли глутатиона и редокс-зависимой регуляции в антиоксидантном действии препаратов, используемых в терапии больных ишемической болезнью сердца и хроническим обструктивным бронхитом. Установлено, что развитие адаптивного антиоксидантного ответа на прооксидантное действие доксорубина в резистентных клетках эритролейкемии человека K562/DOX, аденокарциномы молочной железы MCF-7/DOX, аденокарциномы яичника SKVLB зависит от генеза клеток и имеет разный характер скоординированного изменения экспрессии генов антиоксидантных ферментов, ферментов, контролирующих внутриклеточный уровень глутатиона, глутаредоксин- и тиоредоксин-зависимых систем, пероксиредоксинов, белков транспорта и депонирования железа, ключевых ферментов, катализирующих одно- и двухэлектронное восстановление доксорубина. Обнаружена связь развития антиоксидантного ответа с ростом внутриклеточного уровня транскрипционного фактора Nrf2. Продемонстрировано, что антиоксидантное действие препаратов эмоксипина, элтацина, мелатонина при терапии пожилых больных стабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью и пожилых больных хроническим обструктивным бронхитом связано с повышением клеточного редокс-статуса, характеризуемого ростом соотношения GSH/GSSG, и редокс-зависимой регуляцией соотношения активности глутаредоксина и тиоредоксина в эритроцитах.

ELENA V. KALININA (RUSSIAN FEDERATION)

**ROLE OF OXIDATIVE STRESS AND GLUTATHIONE-DEPENDENT PROCESSES
IN DEVELOPMENT OF CELLULAR DRUG RESISTANCE AND UNDER THERAPY OF
SOME DISEASES**

The thesis is devoted to the study of major biochemical mechanisms of development of adaptive antioxidant response under formation of cancer cells resistance to chemotherapeutic drugs as well as to the investigation of role of glutathione and redox-dependent regulation for antioxidant effect of some drugs used in therapy of aging patients with ischemic heart disease and chronic obstructive bronchitis. It was found that development of adaptive antioxidant response to pro-oxidant action of doxorubicin in resistant human erythroleukemia K562/DOX cells, human breast adenocarcinoma MCF-7/DOX cells, human ovarian adenocarcinoma SKVLB cells depends on cellular genesis and has different character of co-ordinate alterations of genes expression of antioxidant enzymes and enzymes which control intracellular glutathione level, glutaredoxin- and thioredoxin-dependent systems, peroxiredoxins, proteins of iron transport and storage, key enzymes catalysed one- and two-electron reductions of doxorubicin. A relationship between antioxidant response and growth of intracellular level of transcription factor Nrf2 was established. It was shown that antioxidant effect of drugs – emoxypine, eltacin, melatonin in therapy of aging patients with stabilized angina pectoris, postinfarction cardiosclerosis, heart failure and of aging patients with chronic obstructive bronchitis is connected with an elevation of cellular redox status, characterized by an increase of GSH/GSSG ratio, and with redox-dependent regulation of relation of glutaredoxin and thioredoxin activities in erythrocytes.

Подписано в печать: 24.12.2008

Заказ № 1430 Тираж - 120 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

www.autoreferat.ru