

УДК 615.917

МАРКЕРЫ АПОПТОЗА – МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СЕРНИСТОГО ИПРИТА

Н.Ю. Роговская, В.Н. Бабаков

ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии
и экологии человека» ФМБА России, 188663,
Ленинградская область, г.п. Кузьмоловский,
Российская Федерация

Предложены клеточные *in vitro* тест-системы, которые позволяют определять активацию апоптоза при различных концентрациях сернистого иприта (СИ); была оценена эффективность этих тест-систем при действии N-ацетилцистеина (НАС).

В качестве показателей токсического действия СИ оценивали как интегральную цитотоксичность, так и активацию молекулярных мишеней: поли(АДФ-рибоза)полимераза, каспазы-3, каспазы-9, транскрипционного фактора p53 и других маркеров апоптоза в экстрактах клеток человека линии SH-SY5Y при действии СИ и при совместном действии СИ и НАС.

Можно выделить следующие основные мишени токсического действия СИ на клетки: каспазу-3, каспазу-9, PARP1 и транскрипционный фактор p53, который в данной системе является первичной мишенью и активируется через 6 ч после добавления токсиканта. Активные формы ферментов каспазы-3, каспазы-9 и PARP1 заметно накапливаются в клетках через 24 ч после добавления токсиканта.

Ключевые слова: сернистый иприт, N-ацетилцистеин, апоптоз, p53, каспаза-3, каспаза-9, поли(АДФ-рибоза)полимераза, клеточные тест-системы.

Введение. Сернистый иприт [бис(2-хлорэтил)сульфид] является наиболее известным боевым отравляющим веществом кожно-нарывного действия. Сернистый иприт (СИ) является алкилирующим агентом, который действует через циклизацию этиленовой группы с образованием чрезвычайно реакционноспособного сульфониевого иона. Данный электрофил способен реагировать с многочисленными нуклеофильными центрами макромолекул клетки. Продуктами данного взаимодействия являются стабильные аддукты, образование которых может нарушать нормальное функционирование макромолекул [1,2]. Подобные нуклеофильные области присутствуют в пептидах, белках, РНК, ДНК, клеточных мембранах. Хотя химия взаимодействия иприта с клеточными структурами в настоящее время достаточно хорошо исследована, корреляции между химическими взаимодействиями и токсическим действием иприта и других алкилирующих соединений на организм еще не выявлены в полной мере. Тем не менее, в патогенезе токсического действия СИ выделяют, как минимум, три элемента [3].

Алкилирование нуклеотидов может приводить к депуринизации ДНК, сшивкам и разрывам цепей, нарушению нормальной репликации ДНК. Этот процесс приводит в действие механизмы восстановления ДНК путем активации поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP1), что в свою очередь, приводит к резкому понижению клеточного уровня НАД⁺. Серьезное падение уровня внутриклеточного АТФ блокирует гидролиз PARP1 проапоптотическим ферментом каспазой-3 и определяет дальнейший путь гибели клетки по некротическому типу, при меньшем уровне активации PARP1 возможен проапоптотический путь гибели клетки. Таким образом, в зависимости от концентрации СИ, возможны различные пути гибели клетки [4].

Вторым элементом токсического действия СИ является окисление внутриклеточных тиоловых групп [5]. Понижение уровня глутатиона, приводит к активации активных форм кислорода, которые окисляют сульфгидрильные группы белков. В дополнение к окислению сульфгидрильных групп, воздействие СИ, активизирует реакции, включающие генерацию высокоток-

Роговская Надежда Юрьевна (Rogovskaya Nadezhda Yurievna), научный сотрудник ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, niigpesh@rihophe.ru
Бабаков Владимир Николаевич (Babakov Vladimir Nikolaevich), кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, babakov@rihophe.ru

сичных окислителей. Кроме того, свободные радикалы как продукты перекисного окисления липидов (такие как эйкозаноиды и простагландины) активируют основной провоспалительный транскрипционный фактор NF-κB [6].

Более 90% неметаболизированного СИ выводится в первые 48 часов после отравления. И дополнительным непрямым фактором токсического действия СИ является последующая мощная воспалительная реакция, вызванная активацией внутриклеточных путей, контролируемых воспалением, таких как NF-κB и MAP-киназный каскад [7,8].

Молекулярные события, активируемые токсикантом, могут быть мишенью для разработки скрининговых тест-систем, позволяющим как прояснить возможные механизмы токсического действия, определения токсичных концентраций, так и являться ключевым элементом для оценки эффективности потенциальных антидотов. Ингибиторы внутриклеточных путей NF-κB и p38 MAP-киназы снижают уровень провоспалительных цитокинов в кератиноцитах человека на фоне действия СИ [9].

Целью настоящей работы являлось определение ключевых внутриклеточных маркеров апоптоза при действии различных концентраций СИ и при совместном действии СИ и цитопротектора N-ацетилцистеина.

Материалы и методы исследования. Клетки линии SH-SY5Y (ATCC, CRL-2266) культивировали во флаконах в среде DMEM/F12 (Биолот, Санкт-Петербург) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков стрептомицина-пенициллина при 37 °C в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂.

Для определения интегральной цитотоксичности с помощью оборудования iCelligence RTCA (Acea Bioscience, США) 50 тыс. клеток вносили в лунку специализированного планшета, позволяющего определять клеточный индекс в режиме реального времени и культивировали в полной среде DMEM/F12. На следующий день после пассажа к клеткам добавляли равный объем среды, содержащей 2-кратные концентрации СИ и НАС. Мониторинг клеточного индекса проводили в течение 3 дней после добавления токсиканта.

Для получения данных по определению молекулярных маркеров апоптоза, клетки культивировали в 24-луночных планшетах, промывали на следующий день после пассажа, добавляли среду, содержащую СИ и НАС в различных концентрациях, и инкубировали 6 или 24 часа. Маркеры апоптоза были проанализированы в клеточных лизатах с использованием многопараметрической иммунофлуоресцентной технологии Luminex xMAP.

Для получения клеточных лизатов после инкубации, в лунку 24-луночного планшета добавляли 200 мкл лизирующего буфера (Merck/Millipore) с добавлением набора ингибиторов протеаз (Complete, Roche) и ингибиторов фосфатаз (Sigma, Phosphatase Inhibitor Cocktail 2) и 25 Е/мл фермента бензоазы (Sigma) на 10 мин. Экстракт затем центрифугировали при 20000 g при 4°C в течение 20 мин. В супернатанте определяли концентрацию белка по методу Лоури с использованием микропланшетного спектрофотометра Epoch (Biotek). Для дальнейшего анализа, концентрацию белка в экстракте выравнивали до концентрации 0,4 мг/мл. Анализ активированных фосфорилированных или протеолитически фрагментированных белков - маркеров апоптоза проводили с помощью иммунофлуоресцентного метода по технологии Luminex xMAP. Для анализа использовали набор реактивов для определения ранних маркеров апоптоза (7-Plex MILLIPLEX MAP Early Apoptosis Magnetic Bead Kit, Кат. № 48-669MAG Merck/Millipore), который позволяет определять активированные фосфорилированные формы следующих белков: Akt1 (Ser473), p53 (Ser46), BAD (Ser112), Bcl-2 (Ser70), JNK (Thr183/Tyr185), а также активных форм каспазы 8 (гидролизованной по Asp384) и каспазы 9 (гидролизованной по Asp315). В этих же образцах определяли маркеры позднего апоптоза с помощью набора 3-Plex MILLIPLEX MAP Late Apoptosis Magnetic Bead Kit, Кат. № 48-670MAG Merck/Millipore), набор позволяет определять активную форму каспазы 3, фрагментированную каспазой форму PARP1 (cleaved PARP1) и уровень фермента глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в пробе.

Данные, полученные в ходе экспериментальных исследований, были обработаны в программе «Statistica 10.0». Оценку различий средних значений проводили с использованием многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

Результаты и обсуждение. Одним из базовых способов интегральной оценки биологической активности различных соединений является оценка пролиферации и темпов роста популяции, а также цитотоксичности клеток на фоне действия тех или иных соединений. На быструю оценку таких показателей ориентирован ряд методов: методы по оценке классической пролиферации – удвоению ДНК, по включению в ДНК меченых нуклеотидов; по оценке темпов роста, и цитотоксичности – построение кривых роста клеточной популяции, определение маркеров молекулярных событий, тесты на функциональные ответы клеток [10,11].

С помощью измерения электрического импеданса (полного сопротивления) поверхности клеток можно в реальном времени интегрально с

использованием клеточного индекса оценивать целый ряд показателей – скорость роста и пролиферации культуры, степень адгезии и расплывания на подложке, активацию рецепторов и т.п. Оборудование для оценки импеданса монослойной адгезионной культуры использует планшеты с нанесенными электродами на культивируемой поверхности, что позволяет измерять импеданс в реальном времени [12].

На культуру клеток нейробластомы в логарифмической фазе роста был добавлен СИ в диапазоне конечных концентраций 1-100 мкМ. На рисунке 1 представлен график изменения клеточного индекса от времени при внесении различных концентраций СИ. Дозозависимый эффект в этом диапазоне концентраций описывается сигмоидной зависимостью клеточного индекса от логарифма молярной концентрации СИ. С помощью программного обеспечения к прибору был определен показатель IC_{50} СИ для этой культуры клеток на уровне 2,52 мкМ.

Для оценки протекторного действия N-ацетилцистеина, определяли эффект таких же концентраций СИ в присутствии 100 мкМ NAC. N-ацетилцистеин в такой концентрации не влиял на пролиферацию клеточной культуры и не обладал цитотоксическим действием. IC_{50} для СИ в диапазоне концентраций 1-100 мкМ на фоне действия 100 мкМ NAC был определен на уровне 16 мкМ, что более чем в 6 раз превышает IC_{50} для СИ без протекторного действия NAC.

Определение ключевых элементов внутриклеточных путей, определяющих апоптоз, проводили в экстрактах клеток SH-SY5Y по технологии Luminex xMAP.

В таблицах 1 и 2 приведены значения флуоресценции определенных активных форм молекулярных внутриклеточных маркеров апоптоза при действии СИ в концентрациях 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ и при совместном действии СИ и NAC через 6 ч и 24 ч. Изменения флуоресценции относительно контрольного уровня прямо коррелируют с внутриклеточным уровнем соответствующего белка. В качестве положительного контроля в предлагаемой тест-системе использовали активатор апоптоза 2 (1-[(3,4-дихлорфенил)метил]-1H-индол-2,3-дион). Это соединение активирует апоптоз с IC_{50} 4-9 мкМ, обеспечивая цитохром C-зависимую олигомеризацию белка Araf-1 в зрелую апоптосому [13].

Активная, фосфорилированная по Thr183/Tyr185, форма белка JNK не продемонстрировала заметных изменений на фоне действия СИ по сравнению с контролем. Высокая концентрация СИ (100 мкМ) практически не влияет на активацию белка JNK через 6 ч после добавления токсиканта, и снижает уровень фосфорилированного белка через 24 часа. Концен-

трации 50 мкМ и 10 мкМ продемонстрировали разнонаправленные действия на активацию JNK: 50 мкМ СИ снижает уровень белка через 6 ч и повышает через 24 ч; 10 мкМ СИ повышает уровень белка через 6 ч и снижает через 24 ч. NAC не оказывает заметного влияния на эффекты СИ. Активатор апоптоза через 6 часов практически в два раза повышал уровень активной формы белка JNK, который снижался через 24 ч.

СИ в концентрациях 100 мкМ и 50 мкМ в 1,5-1,7 раза повышает уровень активной формы белка Bad, фосфорилированного по Ser112, через 24 ч после добавления к культуре клеток. Активатор апоптоза и NAC не оказывали влияния на уровень активной формы белка Bad.

СИ в изученных концентрациях снижает уровень активной формы белка Bcl-2, фосфорилированного по Ser70, в изучаемые сроки. Активатор апоптоза повышает уровень активной формы белка практически в 3 раза.

Уровень активной фосфорилированной по Ser473 формы белка Akt практически не меняется на фоне действия СИ и других исследованных соединений. Можно отметить незначительное достоверное повышение уровня этого белка через 6 ч после добавления 10 мкМ СИ.

Про-апоптотическая протеаза каспаза-9 активируется ограниченным протеолизом по сайту Asp315. Уровень активной формы этого фермента в 1,5-2 раза повышается по сравнению с соответствующим контролем при суточном действии СИ в концентрациях 50 и 100 мкМ. Активатор апоптоза также повышает уровень активной каспазы-9 через 24 ч после добавления к культуре клеток.

Транскрипционный фактор p53 является одним из ключевых стрессактивируемых внутриклеточных сигнальных белков, регулирующих клеточный цикл. СИ уже через 6 ч дозозависимым образом повышает уровень активной формы белка, фосфорилированного по Ser46. Максимальное повышение в 4,5 раза отмечено для 100 мкМ СИ, действие NAC снижает этот рост до 3 раз для этой же концентрации СИ. Высокий уровень активных форм белка p53 сохраняется и через 24 ч. Положительный контроль – активатор апоптоза через 24 ч продемонстрировал сопоставимый уровень активации с высокими концентрациями СИ.

Заметного влияния СИ и активатор апоптоза на активную форму протеазы каспазы-8, активированной ограниченным протеолизом по сайту Asp384, не оказывал. Можно отметить незначительное достоверное снижение уровня активной формы этого фермента через 6 ч после добавления токсиканта в концентрациях 50 и 100 мкМ.

НАД⁺ зависимый фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ЕС 1.2.1.12,

Таблица 1

Влияние сернистого иприта в различных концентрациях на уровень активных форм маркеров апоптоза (отмечен сайт фосфорилирования/активирующего гидролиза) в лизатах клеток линии SH-SY5Y через 6 и 24 ч, интенсивность флуоресценции, отн. ед. (M±mх)

Вещество	Концентрация	Время инкубации	JNK (Thr183/Tyr185)	Bad (Ser112)	Bcl-2 (Ser70)	Akt (Ser473)	Каспаза-9 (Asp315)
контроль		6ч	194,50± 4,91	251,50± 6,06	47,00± 2,89	92,75± 2,17	25,00± 0,01
		24ч	186,50± 4,91	214,75± 14,58	57,50± 2,02	94,75± 4,47	29,00± 1,15
СИ	100 мкМ	6ч	205,00± 0,58↑\$	262,75± 8,23↑*↑\$	34,50± 1,44↓*↓#	92,00± 2,31↓*	30,50± 3,75
		24ч	153,00± 27,71↓\$	329,00± 57,74	26,50± 5,48↓#	88,75± 1,59↓@	43,75± 5,92↑@
	50 мкМ	6ч	152,75± 7,07↓#	235,25± 3,32	30,00± 1,73	94,50± 2,89↑#	29,50± 1,44
		24ч	217,75± 3,03↑*↑@	372,25± 15,16↑*↑@	46,50± 3,18↓*↑@	103,50± 2,02↑#↑@	60,00± 4,62↑*↑@
	10 мкМ	6ч	233,75± 2,45↑*↑#	298,00± 3,46↑*↑#	52,00± 0,01	114,50± 10,68	31,75± 1,59
		24ч	171,25± 7,07↓*↓@	255,50± 9,53↑*	52,50± 1,44	104,50± 1,44↑#	26,25± 0,43
СИ +NAC 100мкМ	100 мкМ	6ч	157,50± 5,48↓*	243,50± 10,68	36,00± 0,58↓*	92,75± 10,54	27,50± 2,02
		24ч	161,00± 25,98	374,50± 1,44↑*↑@	30,00± 3,46↓*	104,75± 20,64	57,50± 10,97
NAC	100 мкМ	6ч	167,50± 1,44↓*	251,50± 3,18	40,00± 1,73	75,00± 4,62	21,50± 2,02
		24ч	199,50± 3,18↑@	270,50± 7,79↑*	73,00± 1,15↑*↑@	111,25± 0,72↑@	33,00± 1,15↑@
Активатор апоптоза 2	10 мкМ	6ч	395,25± 24,68↑*	250,25± 14,00	132,25± 6,78↑*	91,50± 3,18	30,50± 1,44
		24ч	245,75± 1,88↑*↓@	295,00± 0,58↑*	140,50± 7,22↑*	102,75± 1,01↑@	47,75± 4,76↑*↑@

Примечание:

↓ - понижение ↑ - повышение

* - различия в группе достоверны (p<0,05) по сравнению с контролем;

- различия показателя достоверны (p<0,05) при сравнении между дозировками вещества в одной группе (дозозависимый эффект);

@ - различия показателя достоверны (p<0,05) при сравнении между группами с равной концентрацией СИ, но разным временем отбора пробы;

\$ - различия показателя достоверны (p<0,05) при сравнении группы СИ+NAC 100 мкМ с группой того же времени и концентрации СИ.

GAPDH) катализирует 6 этап гликолиза, но также является транскрипционным фактором и может принимать участие в инициализации апоптоза и вовлекаться в процессы репарации ДНК [14]. Концентрация СИ в 10 мкМ через 6 ч в наибольшей степени повышает уровень белка GAPDH в

клетках, вероятно при перераспределении из клеточных компартментов, таких как митохондрии, через 24 наибольший подъем уровня этого белка отмечен для концентрации 100 мкМ.

Один из ключевых маркеров поздних стадий апоптоза, активная форма фермента каспазы-3,

Таблица 2

Влияние сернистого иприта в различных концентрациях на уровень активных форм маркеров апоптоза (отмечен сайт фосфорилирования/активирующего гидролиза) в лизатах клеток линии SH-SY5Y через 6 и 24 ч., интенсивность флуоресценции, отн. ед. (M±mх)

Вещество	Концентрация	Время инкубации	p53 (Ser46)	Каспаза-8 (Asp384)	GAPDH	PARP-1 (Asp214)	Каспаза-3 (Активная форма)
контроль		6ч	767,50± 51,67	52,75± 1,01	1876,25± 91,08	63,75± 13,13	65,50± 5,20
		24ч	971,50± 126,73	52,00± 0,58	1415,50± 60,33	73,00± 10,68	67,25± 5,34↑@
СИ	100 мкМ	6ч	3405,50± 40,70↑*↑#↑\$	43,25± 0,14↓*↓#↓\$	1711,00± 64,66↓*	121,75± 4,19↑#	135,75± 11,98↑#
		24ч	2806,50± 718,51	46,50± 3,18↓#	2563,00± 107,39↑*↑#↑@	832,00± 11,84↑*↑#↑@	272,00± 37,82↑*
	50 мкМ	6ч	1786,00± 25,40↑*	45,25± 0,72↓*	2113,75± 22,95↑#	80,50± 3,46	98,25± 8,80
		24ч	3955,00± 173,78↑*↑@	56,75± 2,45	2106,25± 35,94↑*	428,75± 7,07↑*↑@	463,75± 7,07↑*↑#↑@
	10 мкМ	6ч	1348,00± 39,84↑*	51,50± 1,44	2559,00± 62,93↑*↑#	166,50± 6,64↑*	119,00± 0,87↑*
		24ч	1353,50± 12,99	56,75± 2,17	936,75± 233,39↓@	78,50± 9,53	54,00± 4,04↓*↓#↓@
СИ +NAC 100мкМ	100 мкМ	6ч	2357,75± 146,50↑*	53,25± 0,14	2516,25± 27,57↑*	139,00± 9,53↑*	115,00± 2,31↑*
		24ч	2503,50± 626,14	44,50± 2,02↓*	1832,75± 71,45↑*↓@	892,50± 313,79	402,75± 167,29
NAC	100 мкМ	6ч	541,50± 3,18↓*	47,50± 1,44↓*	2145,00± 45,90↑*	76,75± 5,92	90,75± 8,23↑*
		24ч	1070,50± 0,87↑@	57,00± 1,73↑*	2477,00± 233,25	147,00± 8,08↑*↑@	108,25± 6,50
Активатор апоптоза 2	10 мкМ	6ч	1464,50± 106,52↑*	57,00± 2,89	2296,75± 59,61↑*	96,75± 15,44	72,25± 2,74
		24ч	3380,75± 131,49↑*↑@	47,50± 3,46↓@	1791,50± 161,95	288,50± 45,03↑*	290,50± 20,50↑*↑@

Примечание:

↓ - понижение ↑ - повышение

* - различия в группе достоверны (p<0,05) по сравнению с контролем;

- различия показателя достоверны (p<0,05) при сравнении между дозировками вещества в одной группе (дозозависимый эффект);

@ - различия показателя достоверны (p<0,05) при сравнении между группами с равной концентрацией СИ, но разным временем отбора пробы;

\$ - различия показателя достоверны (p<0,05) при сравнении группы СИ+NAC 100 мкМ с группой того же времени и концентрации СИ.

через 6 ч действия СИ активируется незначительно. Через 24 ч уровень активного фермента повышается в 7 раз при действии 50 мкМ СИ и в 4 раза при действии 100 мкМ СИ и активатора апоптоза.

Фермент поли(АДФ-рибоза)полимераза (PARP1) является одним из ключевых регуляторов репарации ДНК и молекулярным марке-

ром генотоксического действия СИ. Заметная активация активной формы PARP1, протеолитически гидролизованной по сайту Asp214, происходит через 24 ч после действия СИ, дозозависимым образом, для концентрации 100 мкМ СИ повышение в 11,4 раза, для концентрации 50 мкМ - в 5,9 раза. Активатор апоптоза через

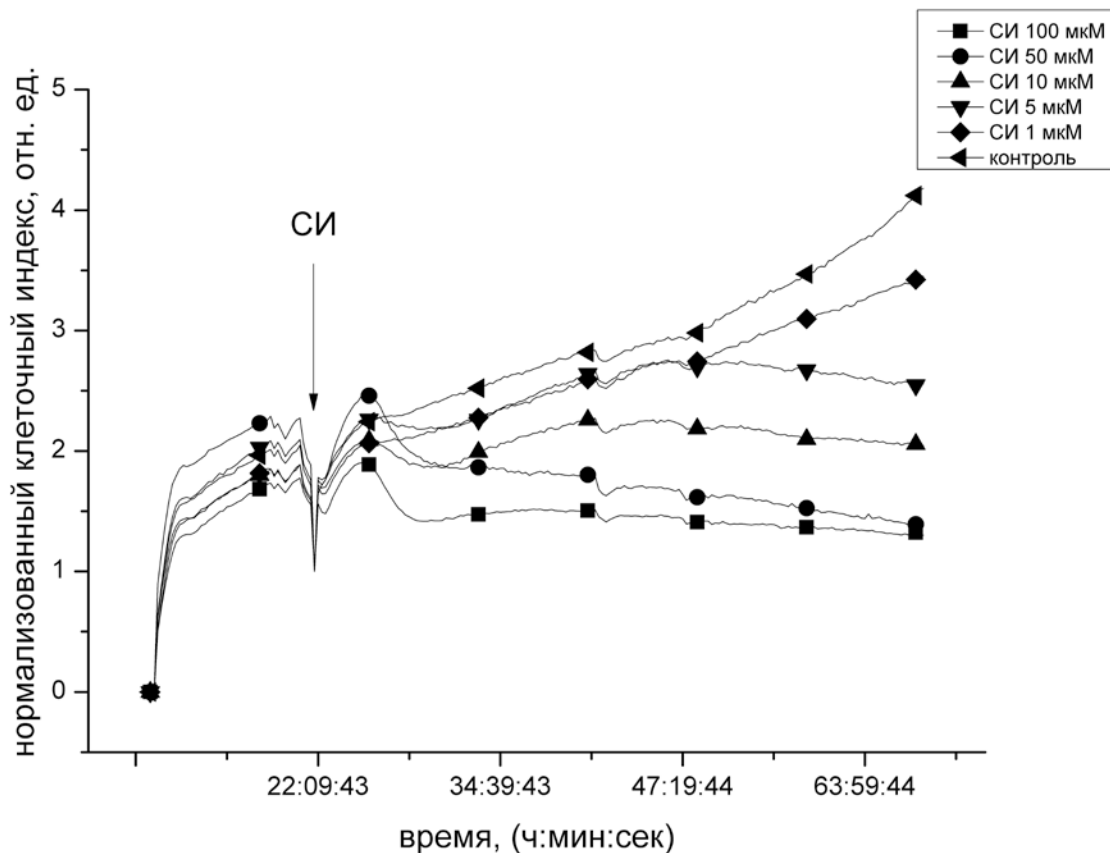


Рис. 1. График изменения нормализованного клеточного индекса клеток линии SH-SY5Y от времени инкубирования с сернистым ипритом в различных концентрациях, момент введения отмечен на графике.

24 ч в 4 раза повышает уровень активного фермента PARP1, вероятно регулируя фермент каспазу-3.

Заключение. Таким образом, из проанализированных молекулярных событий, ассоциированных с проапоптотическим путем гибели клетки, можно выделить следующие основные мишени токсического действия сернистого иприта на клетки: каспазу-3, каспазу-9, PARP1 и транскрипционный фактор p53, который в данной системе является первичной мишенью и активируется через 6 ч после добавления токсиканта. Активные формы ферментов каспазы-3, каспазы-9 и PARP1 заметно накапливаются в клетках через 24 ч после добавления токсиканта. Активация этих же молекулярных мишеней была отмечена в легочной ткани крыс после ингаляции сернистого иприта [15]. Основным фактором, определяющим дальнейший путь гибели клетки, является концентрация СИ. Высокие концентрации СИ приводят к быстрому истощению внутриклеточного НАД⁺ и АТФ, и невозможности дальнейшего энергозависимого апоптотического пути гибели клетки и гибель клетки происходит по пути некроза. Масштабный некроз, в свою очередь, может приводить к

гиперактивации иммунной системы. Меньшие концентрации СИ могут определять дальнейший апоптотический путь гибели клетки. Более высокий уровень активации фермента каспазы-3 при суточном действии 50 мкМ СИ, чем при действии 100 мкМ СИ, демонстрирует проапоптотическое действие меньших концентраций СИ.

Выявленные молекулярные мишени токсического действия СИ можно использовать в оценке эффективности потенциальных антидотов. В качестве средств фармакологической коррекции при интоксикациях соединениями алкилирующего действия можно рассматривать как соединения класса «биоловушек», содержащие свободные сульфгидрильные группы (N-ацетилцистеин, унитиол, восстановленный глутатион и т.п.), так и соединения, влияющие на молекулярные пути, контролируемые воспалением (ингибитор p38 MAP-киназы SB203580 на 90 % снижает продукцию провоспалительных цитокинов, вызванную СИ [16]). Определение молекулярных событий, вызванных токсическим действием ксенобиотиков, возможно не только в экстрактах, полученных из культур клеток, но и в тканевых экстрактах [17].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Подольская Е.П., Бабаков В.Н. Масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации в токсикологическом анализе. Научное приборостроение. 2008; 18 (4): 5-12.
 2. Краснов И.А., Подольская Е.П., Гончаров Н.В. и др. Идентификация алкилированного аддукта сывороточного альбумина человека методами масс-спектрометрии. Научное приборостроение. 2008; 18 (4): 46-53.
 3. Nourani M.R., Mahmoodzadeh Hosseini H., Azimzadeh Jamalkandi S., Imani Fooladi A.A. Cellular and molecular mechanisms of acute exposure to sulfur mustard: a systematic review. J Recept Signal Transduct Res. 2016; 2:1-
 4. Debiak M., Kehe K., Burkle A. Role of poly(ADP-ribose) polymerase in sulfur mustard toxicity. Toxicology. 2009; 263:20-5.
 5. Byrne M.P., Broomfield C.A., Stites W.E. Mustard gas crosslinking of proteins through

preferential alkylation of cysteines. J Protein Chem. 1996; 15:131-6.
 6. Ghabili K., Agutter P.S., Ghanei M., et al. Sulfur mustard toxicity: history, chemistry, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. Critical Rev Toxicol. 2011; 41:384-403.
 7. Minsavage G.D., Dillman J.F. 3rd. Bifunctional alkylating agent-induced p53 and nonclassical nuclear factor kappaB responses and cell death are altered by caffeic acid phenethyl ester: a potential role for antioxidant/electrophilic response-element signaling. J Pharmacol Exp Ther. 2007; 321:202-12.
 8. Rebholz B., Kehe K., Ruzicka T., Rupec R.A. Role of NF-kappaB/RelA and MAPK pathways in keratinocytes in response to sulfur mustard. J Invest Dermatol. 2008; 128(7):1626-32.
 9. Dillman J.F. 3rd, McGary K.L., Schlager J.J. An inhibitor of p38 MAP kinase downregulates cytokine release induced by sulfur mustard exposure in human epidermal keratinocytes. Toxicol In Vitro. 2004; 18(5):593-9.
 10. Schmidt B.Z., Lehmann M., Gutbier S., Nembo E., Noel S., Smirnova L. et al. In vitro acute and developmental neurotoxicity screening: an overview of cellular platforms and high-throughput technical possibilities. Arch Toxicol. 2016; 1-doi:10.1007/s00204-016-1805-9
 11. Szymański P., Markowicz M., Mikiciuk-Olasik E. Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. Int J Mol Sci. 2012; 13(1):427-
 12. Özsvári B., Puskás L. G., Nagy L. I., Kanizsai I., Gyuris M., Madácsi R., et al. A cell-microelectronic sensing technique for the screening of cytoprotective compounds. International journal of molecular medicine. 2010; 25(4): 525-30.
 13. Jayaraman A., Pike C.J. Progesterone attenuates oestrogen neuroprotection via downregulation of oestrogen receptor

expression in cultured neurones. J. Neuroendocrinol. 2009; 21(1):77-
 14. Tarze A., Deniaud A., Le Bras M., Maillier E., Molle D., Larochette N., et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. Oncogene. 2007; 26(18): 2606-20.
 15. Malaviya R., Sunil V.R., Cervelli J., Anderson D.R., Holmes W.W., Conti M.L., et al. Inflammatory effects of inhaled sulfur mustard in rat lung. Toxicol Appl Pharmacol. 2010; 248 (2):89-99.
 16. Ruff A.L., Dillman J.F. 3rd Signaling molecules in sulfur mustard-induced cutaneous injury. ePlasty. 2008; 8: 8-22.
 17. Толкач П.Г., Башарин В.А., Колобов А.А., Роговская Н.Ю., Бабаков В.Н. Влияние пептида КК1 на содержание маркеров апоптоза в головном мозге крыс после острой тяжелой интоксикации оксидом углерода. Токсикологический вестник. 2016; (3):10-4.

REFERENCES:

1. Podolskaya E.P., Babakov V.N. Soft ionization mass-spectrometry in toxicological analysis Nauchnoe priborostroenie (Analytical Instrumentation). 2008; 18 (4): 5-12 (in Russian).
 2. Krasnov I.A., Podolskaya E.P., Goncharov N.V. et al. Identification of human serum albumin alkylated adduct with mass-spectrometry methods. Nauchnoe priborostroenie (Analytical Instrumentation). 2008; 18 (4): 46-53 (in Russian).
 3. Nourani M.R., Mahmoodzadeh Hosseini H., Azimzadeh Jamalkandi S., Imani Fooladi A.A. Cellular and molecular mechanisms of acute exposure to sulfur mustard: a systematic review. J Recept Signal Transduct Res. 2016; 2:1-
 4. Debiak M., Kehe K., Burkle A. Role of poly(ADP-ribose) polymerase in sulfur mustard toxicity. Toxicology 2009; 263:20-5.
 5. Byrne M.P., Broomfield C.A., Stites

W.E. Mustard gas crosslinking of proteins through preferential alkylation of cysteines. J Protein Chem 1996; 15:131-6.
 6. Ghabili K., Agutter P.S., Ghanei M., et al. Sulfur mustard toxicity: history, chemistry, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. Critical Rev Toxicol. 2011; 41:384-403.
 7. Minsavage G.D., Dillman J.F. 3rd. Bifunctional alkylating agent-induced p53 and nonclassical nuclear factor kappaB responses and cell death are altered by caffeic acid phenethyl ester: a potential role for antioxidant/electrophilic response-element signaling. J Pharmacol Exp Ther. 2007; 321:202-12.
 8. Rebholz B., Kehe K., Ruzicka T., Rupec R.A. Role of NF-kappaB/RelA and MAPK pathways in keratinocytes in response to sulfur mustard. J Invest Dermatol. 2008; 128(7):1626-32.
 9. Dillman J.F. 3rd, McGary K.L., Schlager J.J. An inhibitor of p38 MAP kinase downregulates cytokine release induced by sulfur mustard exposure in human epidermal keratinocytes. Toxicol In Vitro. 2004; 18(5):593-9.
 10. Schmidt B.Z., Lehmann M., Gutbier S., Nembo E., Noel S., Smirnova L., et al. In vitro acute and developmental neurotoxicity screening: an overview of cellular platforms and high-throughput technical possibilities. Arch Toxicol. 2016; 1-33.doi:10.1007/s00204-016-1805-9
 11. Szymański P., Markowicz M., Mikiciuk-Olasik E. Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. Int J Mol Sci. 2012; 13(1):427-
 12. Özsvári B., Puskás L. G., Nagy L. I., Kanizsai I., Gyuris M., Madácsi R., et al. A cell-microelectronic sensing technique for the screening of cytoprotective compounds. International journal of molecular medicine. 2010; 25(4): 525-30.
 13. Jayaraman A., Pike C.J. Progesterone attenuates oestrogen neuroprotection

via downregulation of oestrogen receptor expression in cultured neurones. J. Neuroendocrinol. 2009;21 (1):77-
 14. Tarze A., Deniaud A., Le Bras M., Maillier E., Molle D., Larochette N., et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. Oncogene. 2007; 26 (18): 2606-20.
 15. Malaviya R., Sunil V.R., Cervelli J., Anderson D.R., Holmes W.W., Conti M.L., et al. Inflammatory effects of inhaled sulfur mustard in rat lung. Toxicol Appl Pharmacol 2010; 248 (2): 89-99.
 16. Ruff A.L., Dillman J.F. 3rd Signaling molecules in sulfur mustard-induced cutaneous injury. ePlasty. 2008; 8: 8-22.
 17. Tolkach P.G., Basharin V.A., Kolobov A.A., Rogovskaya N. Yu., Babakov V.N. Effect of KK1 peptide on maintenance of apoptosis markers in rats brain caused by severe carbon oxide poisoning. Toksikologicheskii vestnik (Toxicological Review). 2016;(3):10-4 (in Russian).

N. Yu. Rogovskaya, V.N. Babakov

APOPTOSIS MARKERS ARE MOLECULAR TARGETS OF SULFURE MUSTARD TOXIC ACTION

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, 188663 Leningrad region, Russian Federation

Cellular in vitro test systems, which allow to determine apoptosis activation at different concentrations of sulfur mustard, were proposed. The efficiency of these test systems was evaluated by the action of N-acetylcysteine.

As indicators of toxic effect, were evaluated an integral cytotoxicity and activation of the following targets: poly (ADP-ribose) polymerase (PARP1), caspase-3, caspase-9, transcription factor p53 and other markers of apoptosis in human SH-SY5Y cells extracts after sulfur mustard and sulfur mustard with N-acetylcysteine exposure.

We can distinguished the following main target of sulfur mustard toxic action on the cells: caspase-3, caspase-9, PARP1 and p53 transcription factor, which in this system was the primary target and was activated after 6 h toxicant exposure. The active forms of enzymes caspase-3, caspase-9 and PARP1 significantly accumulate in cells after 24 h toxicant exposure.

Keywords: sulfur mustard, N-acetylcysteine, apoptosis, p53, caspase-3, caspase-9, poly (ADP-ribose) polymerase, cellular test systems.

Переработанный материал поступил в редакцию 07.09.2017 г.