

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-квалификационной
работы (диссертации)

Молекулярные механизмы действия противоопухолевых веществ на тромбоциты

Шпакова Валентина Сергеевна

06.06.01 Биологические науки

03.03.01 Физиология

Научный руководитель
д.б.н. Гамбарян Степан Петрович

Санкт-Петербург

2021

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Терапия опухолевых заболеваний очень часто характеризуется развитием серьёзных побочных эффектов, оказывающих влияние на разные системы организма, в том числе на систему гемостаза [1]. Причём применение противоопухолевой терапии может привести как к увеличению числа тромбоцитов в кровотоке (тромбоцитоз), так и снижением их общего количества относительно нормальных показателей (тромбоцитопения) [1, 2]. Оба этих состояния представляют серьёзную проблему с точки зрения проведения терапии, поскольку могут привести к развитию неблагоприятных побочных эффектов, включающих как образование тромбов, так и серьёзные кровотечения. При этом развитие тромбоцитоза требует дополнительного медикаментозного вмешательства, тогда как тромбоцитопения лечится только путём трансфузии тромбоцитов, что влечёт за собой определенные риски [2]. Оба этих состояния влияют на эффективность терапии, поскольку заставляют откладывать терапию или уменьшать дозировку препаратов, что в конечном итоге влияет на выживаемость и качество жизни больных [1, 2]. Причём механизм действия противоопухолевых агентов сильно зависит от их химической структуры, что затрудняет определение механизма их воздействия на тромбоциты и купирование побочного действия. В связи с этим необходимым является проведение исследований, направленных на раскрытие молекулярного механизма действия на тромбоциты противоопухолевых препаратов или веществ, обладающих противоопухолевой активностью, которые могут быть использованы в терапии.

Для проведения данного исследования были выбраны 8 веществ различной химической природы, относящиеся к разным классам. Первая группа представлена низкомолекулярными ингибиторами белков семейства BCL-2, характеризующимися разной аффинностью к основному антиапоптотическому белку в тромбоцитах BCL-X_L (ABT-737, WENI-539, обатоклакс и госсипол). Во вторую группу вошли вещества растительного происхождения (ресвератрол, нобилетин и куркумин), а в третью – селективный ингибитор липоксигеназы-12 (12-LOX) ML355. Все эти соединения обладают противоопухолевой активностью и либо находятся в стадии разработки, либо проходят клинические испытания.

Цель работы: исследовать молекулярные механизмы действия противоопухолевых веществ на тромбоциты.

Задачи исследования:

- 1) Оценить влияние исследуемых веществ на активацию тромбоцитов по уровню активации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$.
- 2) Определить влияние исследуемых веществ на ключевые сигнальные молекулы, участвующие в активации тромбоцитов (PI3K, PKB, Syk, p38, Erk1/2).
- 3) Проанализировать влияние исследуемых веществ на жизнеспособность тромбоцитов, которая может измеряться по уровню экстернализации фосфатидилсерина, активации капсазы-3 и активности внутриклеточных эстераз.
- 4) Определить активность основных ингибирующих АЦ/цАМФ/РКА и ГЦ/цГМФ/РКГ сигнальных путей в тромбоцитах по уровню фосфорилирования белка VASP, и по возможности выявить механизм их активации после введения исследуемых веществ.

Положения, выносимые на защиту

1. Ингибиторы белков семейства BCL-2, обладающие высокой аффинностью к белку BCL-XL (ABT-737, WENI-539) вызывают апоптоз тромбоцитов и блокируют их активацию за счет каспаз-зависимой активации РКА, тогда как действие на тромбоциты веществ с низкой аффинностью к белку BCL-XL (обатоклакс и госсипол) опосредовано каспаз-независимой гибелью тромбоцитов.
2. Вещества растительного происхождения, обладающие противоопухолевой активностью (куркумин, ресвератрол и нобилетин), блокируют активацию тромбоцитов разными механизмами. Куркумин и нобилетин вызывают активацию АЦ/цАМФ/РКА сигнальной системы за счет активации рецептора A_{2A} к аденозину, при этом куркумин индуцирует образование прокоагулянтных. Основным ингибирующим эффектом ресвератрола связан с блокирование образования реактивных форм кислорода в тромбоцитах.
3. 12-LOX ингибитор ML355 в низких дозах снижет активацию тромбоцитов за счет действия на 12-LOX и блокирования образования ROS, тогда как в высоких дозах вызывает активацию АЦ/цАМФ/РКА сигнальной системы

Научная новизна работы

В ходе исследования влияния противоопухолевых веществ на тромбоциты было показано, что действие веществ может быть обусловлено запуском разных сигнальных

каскадов и воздействием на различные сигнальные системы. Так, ингибиторы белков семейства BCL-2 могли вызывать апоптоз тромбоцитов, который был связан с активацией PKA, либо вызывать каспаз-независимую гибель тромбоцитов. Действие куркумина и нобилетина было опосредовано активацией рецептора A_{2A} к аденозину, и последующим увеличением цАМФ, который вызывал активацию PKA. Основным ингибирующим механизмом ресвератрола на тромбоциты был опосредован снижением уровня ROS в активированных тромбоцитах. Специфический ингибитор 12-LOX ML355, в низких дозах блокировал активацию тромбоцитов за счёт снижения уровня ROS, тогда как в высоких дозах вызывал активацию АЦ/цАМФ/PKA сигнальной системы в тромбоцитах. Описанные оригинальные данные демонстрируют важность проведения доклинических исследований по определению механизмов действия противоопухолевых веществ на функциональную активность тромбоцитов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Практическая значимость данной работы заключается в получении новых данных о влиянии противоопухолевых веществ на тромбоциты, которые помогут разработать подходы, позволяющие избежать неблагоприятных побочных эффектов противоопухолевых веществ на систему гемостаза. Также полученные данные могут быть использованы для дальнейших исследований эффектов этих веществ на другие системы организма. Полученные данные представляют также ценность и для фундаментальной науки, поскольку позволяют развить представления о функционировании и связи различных сигнальных систем в тромбоцитах.

Апробация полученных результатов

Результаты, вошедшие в диссертационную работу, представлены в виде устных и стендовых докладов на следующих конференциях: XXIV Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины». (2018 г. Санкт-Петербург, Россия); Всероссийская молодежная медицинская конференция с международным участием «Алмазовские чтения 2018». (2018 г. Санкт-Петербург, Россия); 26th Euroconference on Apoptosis. (2018, St. Petersburg, Russia); 10-я международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». (2019 г. Пущино, Россия); «II объединённый научный форум. VI съезд физиологов СНГ. VI съезд биохимиков России. IX Российский симпозиум «Белки и пептиды». (2019 г. Сочи-Дагомыс, Россия); International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Virtual

Congress 2020 (2020, Milan, Italy); International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Virtual Congress 2021 (2021, Philadelphia, USA).

Публикации

Всего по теме диссертации было опубликовано 18 работ, 6 из которых являются статьями в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, остальные – тезисы конференций.

Материалы и методы

Материалы

В работе использовались следующие реактивы: госсипол, куркумин, нобилетин SQ22536, ODQ, форсколин, L161 982, ZM 241385 (Sigma-Aldrich, Германия); АВТ-737, обатоклакс (Selleck Chemicals, Германия); ML355, U46619 (Cayman Chemical, США), WENI-539 (MedChem Express, Германия); Z-DEVD, Z-VEID (Calbiochem, Germany); Rp-8-BrcAMPS и Rp-8-BrcGMPS (BioLog, Germany); ресвератрол (EMD Millipore Corp, USA); тромбин, выделенный из человеческой плазмы (Roche, Германия); перекрестно-сшитый родственный коллагену пептид (CRP-XL), любезно предоставленный проф. М.А. Пантелеевым (Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва); фибриноген, меченый Alexa- Fluor 647 (Molecular Probes, Германия); кальцеин-АМ (Molecular Probes, Германия); конъюгированный с R-фикоэритрином (PE) аннексин V, конъюгированный с PE CD62P, конъюгированный с PE аннексин-V, конъюгированный с FITC CD41 (BD Bioscience, Германия); TMRE (Invitrogen, USA); 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) (Calbiochem, Германия); индуктор апоптоза АВТ-737 (Selleckchem, Германия); SNP (Alexis Biochemicals, Германия); Cay 10441, BW A868C (Cayman Chemical, США); моноклональные фосфо-VASPser239 и фосфо-VASPser157 антитела (Nano Tools, Германия); антитела к каспазе 3 (арт. 9662), фосфо-Act (арт. 4060), фосфо-PI3K (арт. 17366), фосфо-Erk1/2 (арт. 4370), фосфо-p38 (арт. 9216), фосфо-Syk (арт. 2710) антитела, и антитела к актину (арт. 4970) (Cell Signaling, Германия); конъюгированные с пероксидазой хрена anti-mouse и anti-rabbit IgG вторичные антитела (Amersham, Германия).

Выделение тромбоцитов

Все эксперименты проводились на тромбоцитах человека, которые были выделены из крови здоровых добровольцев. Все экспериментальные протоколы были утверждены и одобрены этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии РАН

(протокол № 3-03 от 02.03.20) и соответствуют Хельсинкской декларации. Кровь отбиралась в пробирку S-Monovette© с цитратным буфером (12 мМ лимонной кислоты, 15 мМ цитрата натрия, 25 мМ D-глюкозы, 2 мкМ EGTA), после чего проводился анализ цельной крови при помощи гематологического счётчика Medonic-M20 (Boule Medical AB, Швеция), и цельная кровь центрифугировалась 7 мин при 200 g (центрифуга CM-6M ELMI). Далее, для экспериментов, проводимых на плазме, обогащенной тромбоцитами (platelet-rich plasma, PRP), PRP разводили в HEPES-буфере (150 мМ хлорида натрия, 5 мМ хлорида калия, 1 мМ хлорида магния, 1 мМ хлорида кальция, 5 мМ D-глюкозы, 10 мМ HEPES, pH 7.4) в соотношении 1:15. Для экспериментов на отмытых тромбоцитах PRP разводили раствором CGS (120 мМ хлорида натрия, 12 мМ тринатрий цитрата, 10 мМ D-глюкозы, pH 6.5) в пропорции 1:1 и центрифугировали при 330 g в течение 4 мин. Полученный осадок растворяли в 1.5 мл раствора CGS и вновь центрифугировали 4 мин при 330 g, после чего осадок ресуспендировали в 0.5 мл HEPES-буфера. Далее к отмытым тромбоцитам добавляли CaCl₂ в конечной концентрации 1 мМ. Для проведения опытов использовали рабочую концентрацию тромбоцитов 1×10^8 /мл для проточной цитометрии и $3-6 \times 10^8$ /мл для Вестерн-блот анализа.

Проточная цитометрия

Анализ проводился на проточном цитометре Navios™ (Beckman Coulter, США; прибор ЦКП ИЭФБ РАН) или на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, USA). Каждый образец оценивался по 15000 событиям. Полученные данные обрабатывались при помощи Cytometry List Mode Data Acquisition & Analysis Software for Navios cytometer 1.2.

а) Оценка активации тромбоцитов

Активация тромбоцитов оценивалась по степени связывания активированных интегринов α IIb β 3 с фибриногеном, меченым флуоресцентным красителем Alexa-Fluor 647 и по связыванию P-селектина с CD62, меченого PE. Для оценки активации интегринов α IIb β 3 к отмытым тромбоцитам (1×10^8 /мл) добавляли фибриноген (15 μ г/мл, конечная концентрация), после чего вводили исследуемые вещества в нужных концентрациях и инкубировали тромбоциты на термостате при 37°C в течение установленного времени. Затем в пробы добавляли активаторы тромбин (50 mU/мл, конечная концентрация), U46619 (10 μ М, конечная концентрация) или CRP-XL (0.5 μ г \times мл⁻¹, конечная концентрация), инкубировали еще 2 мин при 37°C и останавливали реакцию в фосфатном буфере (PBS) в соотношении 1:40.

Для оценки высвобождения α -гранул тромбоциты сперва инкубировали с исследуемыми веществами в течение нужного времени на термостате при 37°C, после чего добавляли активатор (тромбин, U46619 или CRP-XL) и через 2 мин вводили CD62-PE (1:10). Через 5 мин реакцию останавливали в 400 μ л PBS буфера и измеряли интенсивность флуоресценции на проточном цитометре.

Для экспериментов на PRP в разбавленную в Heparin буфере плазму при комнатной температуре вводили фибриноген (15 μ г/мл, конечная концентрация) и необходимые вещества в нужной концентрации, и инкубировали установленное время. Для активации тромбоцитов в пробы добавляли ADP (5 μ М, конечная концентрация), инкубировали еще 2 мин и в каждую пробирку добавляли CaCl₂ в конечной концентрации 1 мМ (1 мин), после чего останавливали реакцию PBS буфере (1:40) и анализировали интенсивность флуоресценции при помощи проточного цитометра.

б) определение мембранного потенциала митохондрий

Для определения мембранного потенциала митохондрий в пробы с отмытыми тромбоцитами добавляли TMPE краситель (1:10), после чего добавляли исследуемые вещества в нужных концентрациях, инкубировали в течение указанного времени, после чего останавливали реакцию 400 μ л фосфатного буфера и анализировали на проточном цитометре.

в) оценка экстернализации фосфатидилсерина (PS)

Для оценки экстернализации PS использовали аннексин V, конъюгированный с PE. Отмытые тромбоциты инкубировали с исследуемыми веществами в течение установленного времени, после чего к пробам добавляли аннексин V-PE (1 : 10), далее суспензию сразу разбавляли аннексин V связывающим буфером (1:20) (140 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, 2.5 мМ CaCl₂), необходимого для связывания аннексина V-PE с PS, после чего пробы инкубировали 10 мин при комнатной температуре в темноте и анализировали на проточном цитометре.

г) определение жизнеспособности тромбоцитов

Для определения жизнеспособности тромбоцитов использовался флуоресцентный краситель кальцеин-AM. Кальцеин-AM свободно проходит через клеточную мембрану и в связанном с ацетометильным эфиром (AM) состоянии не обладает флуоресцентными свойствами. В живых клетках кальцеин-AM претерпевает изменения посредством

гидролиза внутриклеточными эстеразами ацетометильного остатка, после которого кальций приобретает флуоресцентные свойства с длиной волны испускания в зеленом диапазоне спектра.

Для определения жизнеспособности тромбоцитов в пробы с отмытыми тромбоцитами добавляли кальцеин-АМ (0,2 $\mu\text{M}/\text{мл}$, конечная концентрация), далее вводили исследуемые вещества и инкубировали установленное время на термостате при 37°C. При этом с кальцеин-АМ клетки инкубировали не менее получаса перед измерениями. Далее пробы разбавляли в PBS (1:40) и анализировали на проточном цитометре.

д) определение уровня реактивных форм кислорода (ROS) в тромбоцитах

Для определения уровня ROS в тромбоцитах использовался флуорогенный краситель 2',7' – дихлорфлуоресцин диацетат (DCF-DA или H₂DCF-DA), свободно проникающий через клеточную мембрану. После попадания в клетку DCF-DA подвергается деацетилированию внутриклеточными эстеразами, после чего может быть окислирован ROS до 2', 7' – дихлорфлуоресцина (DCF), который обладает выраженными флуоресцентными свойствами с волной испускания в 535 нм (зеленый диапазон спектра).

Для определения уровня ROS в тромбоцитах в пробы с отмытыми тромбоцитами добавляли DCF-DA (10 μM , конечная концентрация), далее вводили исследуемые вещества и инкубировали установленное время на термостате при 37°C. При этом с DCF-DA клетки инкубировали не менее получаса перед измерениями. Далее пробы разбавляли в PBS (1:40) и анализировали на проточном цитометре.

е) определение количества молекул рецептора $\alpha\text{IIb}\beta_3$ на тромбоцитах

Для определения количества $\alpha\text{IIb}\beta_3$ на тромбоцитах использовали антитела CD41, конъюгированные с флуоресцентным красителем, которые специфично связываются с α -цепью рецептора (αIIb). В отмытые тромбоциты добавляли CD41, после чего инкубировали с исследуемыми веществами в течение установленного времени, разбавляли пробы в буфере PBS (1:40) и анализировали на проточном цитометре.

Вестерн блот анализ

Для определения активации каспазы 3 и уровня фосфорилирования белков пробы инкубировали с исследуемыми веществами в течение указанного времени мин при 37°C, после чего в пропорции 1 : 1 добавляли лизирующий буфер, содержащий додецил сульфат натрия (SDS) и меркаптоэтанол (10%). Затем пробы кипятились 5 мин при 95°C. Белки

разделяли при помощи электрофореза в SDS полиакриламидном геле (SDS-PAGE), затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану при помощи мокрого переноса (wet transfer). Далее мембрану отмывали в растворе TBS-T (20 mM трис(гидроксиметил)аминометана, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) в течение 30 мин, после чего мембрану инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°C. Неспецифическое связывание блокировали 3% раствором обезжиренного молока, растворенного в TBS-T буфере. Для визуализации сигнала применялись вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Проявка мембран осуществлялась при помощи сканера C-DiGit (Li-COR, США). Анализ хемилюминесценции проводили с использованием Image Studio Digits Ver.5.2.

Статистическая обработка

Все эксперименты на проточном цитометре были выполнены в количестве не менее 7. Данные выражались как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение. Вестерн блот эксперименты были выполнены в количестве не менее 4. Полученные блоты анализировали при помощи Image Studio Digits Ver.5.2. Для каждого блота определяли оптическую плотность относительно актина, которую выражали по отношению к контролю, принятому за единицу. Данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение.

Статистическая обработка проводилась с помощью программы GraphPadPrism v8. Достоверность различий средних значений между двумя группами определялась при помощи U-критерия Манна-Уитни. Значения $p < 0.05$ принимались как статистически значимые.

В случае необходимости проведения множественных сравнений все переменные были приведены к нормальному распределению при помощи критерия Шапиро-Уилка ($p < 0.05$) и разница между группами определялась при помощи однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). В случае гомоскедастичности групп (критерий Левена, $p < 0.05$) для post hoc анализа использовался критерий действительно значимого различия Таки. В случае, когда гомоскедастичность подтвердить не удавалось, для post hoc анализа использовали Tamhane's T2 тест. Значения $p < 0.05$ принимались как статистически значимые.

Результаты и обсуждение

1. Влияние ингибиторов VCL-2 белков на функциональную активность тромбоцитов

Белки семейства VCL-2 давно привлекают внимание учёных благодаря участию в регулировании апоптоза в клетках. Однако применение некоторых VCL-2 ингибиторов приводило к сильной тромбоцитопении у пациентов [3]. При этом для некоторых из них показана способность влиять на кальциевый ответ тромбоцитов на агонисты, что препятствует активации тромбоцитов [4]. Однако влияние ингибиторов белков VCL-2 на другие сигнальные системы тромбоцитов не было изучено. В данной работе использовались 4 различных соединения, обладающих разной аффинностью к основному антиапоптотическому белку в тромбоцитах VCL-X_L. WENI-539 и АВТ-737 связывают белок VCL-X_L с высокой аффинностью, тогда как обатоклакс и госсипол характеризуются низким уровнем аффинности к этому белку [5].

1.1 Ингибиторы VCL-2 белков блокируют активацию тромбоцитов и вызывают их гибель разными механизмами

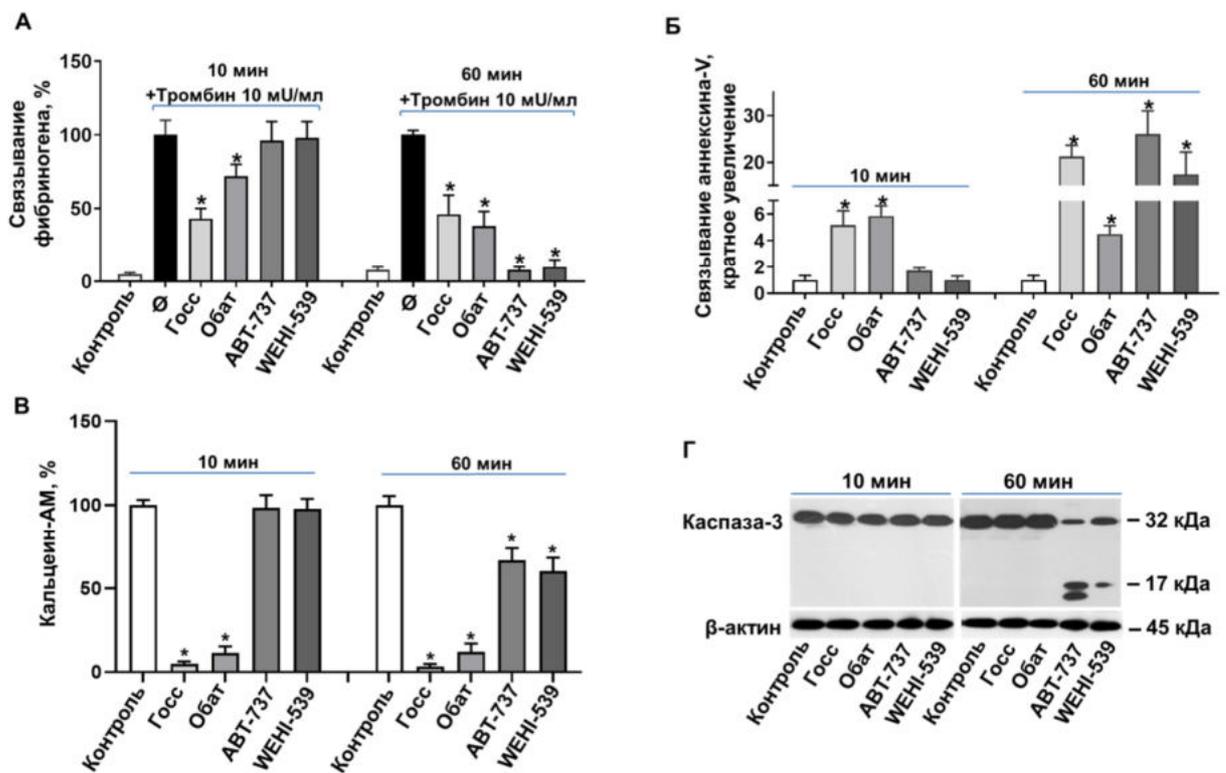


Рис. 1. Ингибиторы VCL-2 белков блокируют активацию тромбоцитов и вызывают их гибель разными механизмами.

Отмытые тромбоциты (1×10^8 /мл для проточной цитометрии и 3×10^8 /мл для вестерн-блоттинга) инкубировали с госсиполом (Госс, 40 μ M), обатоклаксом (Обат, 40 μ M), АВТ-737 (1 μ M) или WENI-539 (1 μ M) в течение указанного времени, после чего анализировали на проточном цитометре. (А) К отмытым тромбоцитам добавляли фибриноген, конъюгированный с Alexa-647 (15 μ g/мл, конечная концентрация) за 15 мин до активации. В качестве активатора использовали тромбин (10 мU/мл, 2 мин). (Б) Для определения уровня экстернализации PS в пробы добавляли аннексин-V (1:10) и далее разбавляли аннексин-связывающим раствором (1:20), инкубировали пробы 10 мин в темноте и анализировали на проточном цитометре. (В) Кальцеин-AM (1 μ M) добавляли за 30 мин до измерения. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (SD). $n = 6$, * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем, принятым (Б) за 1 или (В) за 100%. В (А) активация тромбоцитов тромбином принята за 100%. (Г) Вестерн-блот каспазы-3. $n = 4$.

Все выбранные BCL-2 ингибиторы вызывали блокирование активации интегринов α IIb β 3 в тромбоцитах, активированных тромбином (10 мU/мл) (Рис.1А). При этом низкоаффинные ингибиторы BCL-X_L (обатоклакс и госсипол) вызывали снижение активации через 10 мин, а высокоаффинные ингибиторы (АВТ-737 и WENI-539) – через 1 час. В то же время, АВТ-737 и WENI-539 вызывали экстернализацию PS (Рис. 1Б), снижение активности эстераз (Рис.1В) и расщепление каспазы-3 (Рис. 1Г) в тромбоцитах, тогда как обатоклакс и госсипол вызывали экстернализацию PS (Рис. 1Б), снижали активность внутриклеточных эстераз (Рис. 1В), но не влияли на активность каспазы-3 (Рис. 1Г). Эти данные позволяют сделать вывод, что высокоаффинные ингибиторы BCL-X_L вызывают апоптоз тромбоцитов, а ингибиторы с низкой аффинностью к BCL-X_L вызывают каспаз-независимую гибель тромбоцитов.

1.2 Высокоаффинные ингибиторы BCL-X_L белка вызывают каспаз-зависимую активацию PKA в тромбоцитах

Основными ингибирующими системами в тромбоцитах являются аденилат- (АЦ) и гуанилатциклазная (ГЦ) сигнальные системы, которые активируются специальными молекулами, выделяемыми эндотелиальными клетками кровеносных сосудов для предотвращения нежелательной активации тромбоцитов. Основной путь активации АЦ связан с рецепторами, ассоциированными с G-белком (GPCR) и содержащими G_{as} субъединицу в своём составе. Главным активатором АЦ в сосудах является простагландин (или простагландин I₂), который связываясь со специфическим IP рецептором активирует АЦ, запуская таким образом синтез циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), активирующего цАМФ-зависимую протеинкиназу А (PKA) [6]. Второй сигнальный путь активируется молекулой оксида азота (NO), которая также выделяется клетками эндотелия и, свободно проникая через мембрану тромбоцитов в цитозоль, активирует ГЦ,

запускающую синтез циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) и последующую активацию цГМФ-зависимой протеинкиназы G (PKG) [6]. Оба этих сигнальных пути воздействуют на ключевые сигнальные события в передаче активационного сигнала в тромбоцитах, блокируя их адгезию, агрегацию и реакцию shape change. Активность этих сигнальных систем в тромбоцитах можно определить по фосфорилированию субстратных белков. Одним из установленных субстратов PKA и PKG является белок VASP, который фосфорилируется этими киназами по двум сайтам – Ser157 и Ser239 [7]. Причем PKA фосфорилирует VASP преимущественно по Ser157, а PKG – по Ser239, тогда как при сильной активации любой из киназ фосфорилированию подвергаются оба сайта [8].

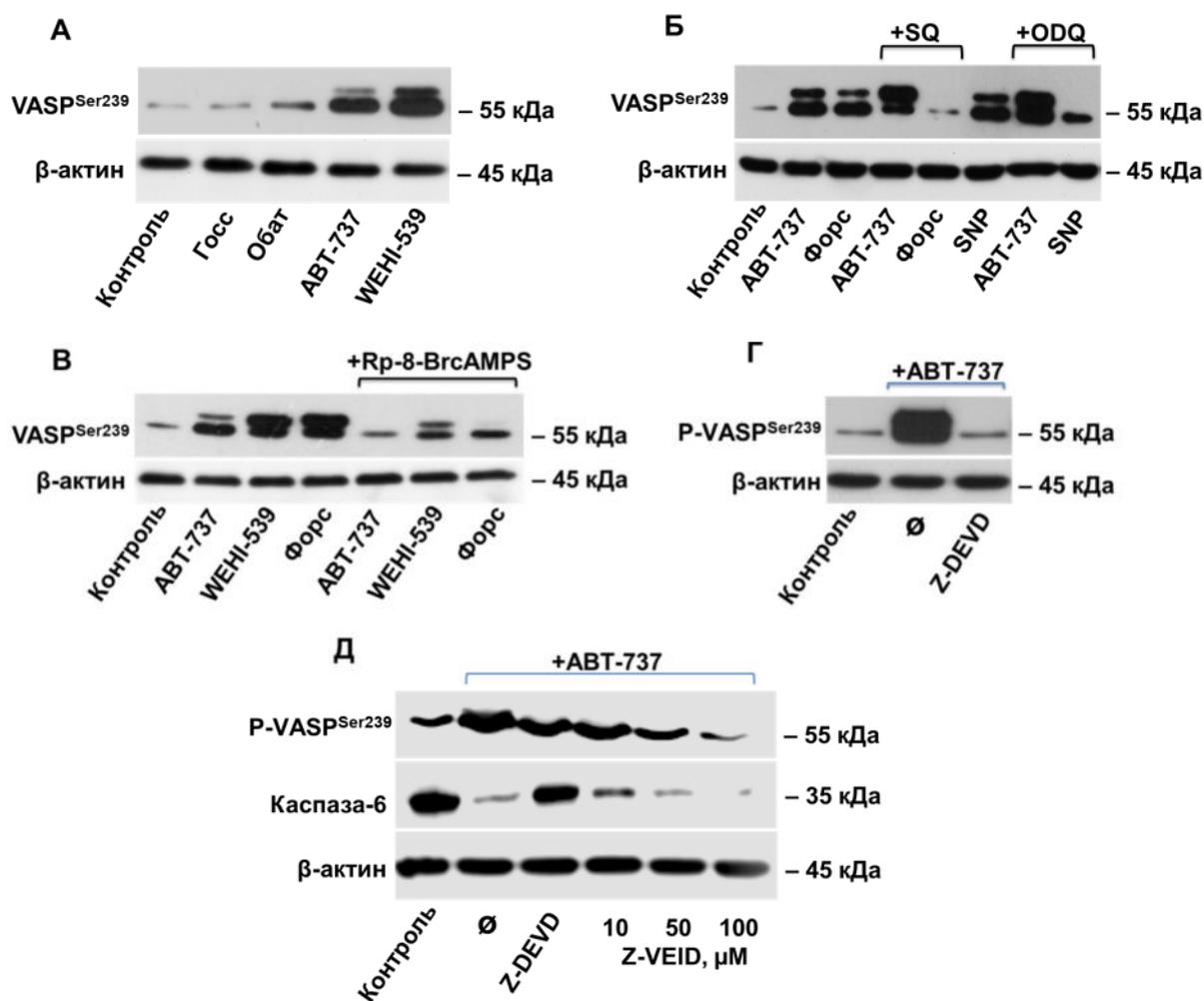


Рис. 2. Высокоаффинные ингибиторы BCL-X_L белка вызывают каспаз-зависимую активацию PKA в тромбоцитах

Отмытые тромбоциты (3×10^8 /мл) (А) инкубировали с госсиполом (Госс, 40 μМ), обатоклаксом (Обат, 40 μМ), АВТ-737 (1 μМ) или WENI-539 (1 μМ) в течение указанного времени, после чего анализировали при помощи вестерн блоттинга. (Б) Тромбоциты преинкубировали с SQ22536 (SQ, 100 μМ) или ODQ (1 μМ) в течение 10 мин, затем вводили АВТ-737 (1 μМ) и через 60 мин анализировали при помощи вестерн блоттинга.

Активатор АЦ форсколин (Форс, 5 μM , 2 мин) и донор NO SNP (1 μM , 2 мин) использовали в качестве позитивного контроля. (В) Тромбоциты преинкубировали с ингибитором PKA Rp-8-BrcAMPS (200 μM) в течение 10 мин, затем вводили АВТ-737 (1 μM) или WENI-539 (1 μM), инкубировали ещё 60 мин, после чего анализировали при помощи вестерн блоттинга. (Г, Д) Тромбоциты преинкубировали с ингибиторами Z-DEVD (100 μM) или Z-VEID в указанных концентрациях в течение 10 мин, далее вводили АВТ-737 (0,3 μM), инкубировали еще 60 мин, после чего анализировали при помощи вестерн блоттинга. Актин использовался для контроля количества белка. Все данные были получены минимум из 4 независимых экспериментов.

Согласно полученным нами данным, высокоаффинные блокаторы BCL-X_L (АВТ-737 и WENI-539) вызывали фосфорилирование белка VASP через 1 час после введения, что совпадает по времени с индукцией апоптоза в тромбоцитах и свидетельствует об активации PKA или PKG (Рис.2А). Низкоаффинные блокаторы BCL-X_L (обатоклакс и госсипол) не влияли на уровень фосфорилирования VASP (Рис. 2А) и, следовательно, не вызывали активацию PKA/PKG ингибиторных систем. Для определения механизма активации PKA/PKG систем в тромбоцитах после воздействия АВТ-737 или WENI-539, использовали ингибиторы АЦ SQ22536 и ГЦ ODQ. Ни SQ22536, ни ODQ не блокировали фосфорилирование VASP, вызванное АВТ-737 (Рис. 2Б), из чего можно сделать вывод о том, это фосфорилирование не связано с повышением уровня циклических нуклеотидов. Поэтому следующим шагом стала проверка того, могут ли высокоаффинные блокаторы BCL-X_L влиять на активность самих PKA или PKG. Оказалось, что введение ингибитора PKA Rp-8-BrcAMPS вызывало снижение фосфорилирования VASP (Рис. 2В), что свидетельствует об активации PKA после введения АВТ-737. Поскольку активация PKA совпадает по времени с запуском апоптоза тромбоцитов, следующим шагом стало исследование взаимосвязи между активностью каспаз, являющихся основными эффекторными белками апоптоза, и запуском PKA-зависимых эффектов в тромбоцитах. При помощи метода фосфопротеомики было показано, что в тромбоцитах содержится довольно большое количество двух эффекторных каспаз – каспазы-3 и каспазы-6 [9]. Несмотря на то, что обе эти каспазы являются эффекторными, каспаза-6 выделяется на фоне остальных белков семейства за счёт того, что активируется каспазой-3, а не другими эффекторными каспазами [10]. Также для каспазы-6 в некоторых случаях показана способность к самоактивации, что играет существенную роль в развитии различных нейродегенеративных процессов [10].

Для того, чтобы проверить связь между апоптозом тромбоцитов и активацией PKA, использовали два ингибитора каспаз – Z-DEVD, ингибирующий каспазу-3 и Z-VEID, ингибирующий каспазу-6. На удивление, оба этих ингибитора вызывали блокирование фосфорилирования VASP, вызванного АВТ-737 (Рис. 2Г, Д). Эти данные свидетельствуют

о каспаз-зависимой активации РКА в тромбоцитах, индуцируемой высокоаффинными ингибиторами белка BCL-X_L. Поскольку каспаза-6 является нижележащим белком в сигнальном пути активации каспаз, можно сделать вывод о каспаз-6-зависимой активации РКА. Однако механизм этой активации неясен и требует дальнейших исследований.

2. Влияние нобилетина на функциональную активность тромбоцитов

Нобилетин относится к полиметоксилированным флавонам и содержится в кожуре многих незрелых цитрусовых. Это соединение обладает множеством полезных свойств, среди которых описаны противоопухолевая и антитромбоцитарная активности [11, 12]. Нобилетин исследуется в качестве потенциального противоопухолевого препарата как в монотерапии, так и в комбинации с другими веществами, поскольку способствует преодолению множественной лекарственной резистентности опухолевых клеток, индуцируя их гибель [13]. Также нобилетин обладает выраженной антитромбоцитарной активностью благодаря способности блокировать адгезию и агрегацию тромбоцитов [12, 14]. Однако молекулярный механизм действия этого соединения на тромбоциты остаётся плохо изученным.

2.1 Нобилетин блокирует активацию тромбоцитов за счёт запуска АЦ/цАМФ/РКА сигнального пути

В экспериментах по оценке влияния нобилетина на активность тромбоцитов нобилетин блокировал активацию тромбоцитов, индуцированную активатором коллагенового рецептора GPVI Cpr-XL или тромбином (Рис. 3А, Б). Анализ фосфорилирования белка VASP показал, что ингибирующее влияние нобилетина на тромбоциты опосредовано активацией РКА/ПКГ ингибирующих сигнальных систем (Рис. 3В), которое возрастало со временем (Рис. 3Г). При помощи ингибиторов АЦ и ГЦ удалось показать, что влияние нобилетина опосредовано активацией АЦ/цАМФ/РКА, но не ГЦ/цГМФ/ПКГ сигнальной системы (Рис. 3Д).

2.2 Блокирующее действие нобилетина на активацию тромбоцитов опосредовано активацией рецептора A_{2A} к аденозину

Активация АЦ в клетках в основном связана с работой поверхностных рецепторов, относящихся к семейству GPCR и содержащих G_{as}-субъединицу в своём составе. В тромбоцитах АЦ активируется после воздействия различных простагландинов, связывающихся с простагландиновыми рецепторами. Так, на тромбоцитах присутствуют рецептор DP1 к простагландину D (PGD), упоминавшийся ранее рецептор IP к проста-

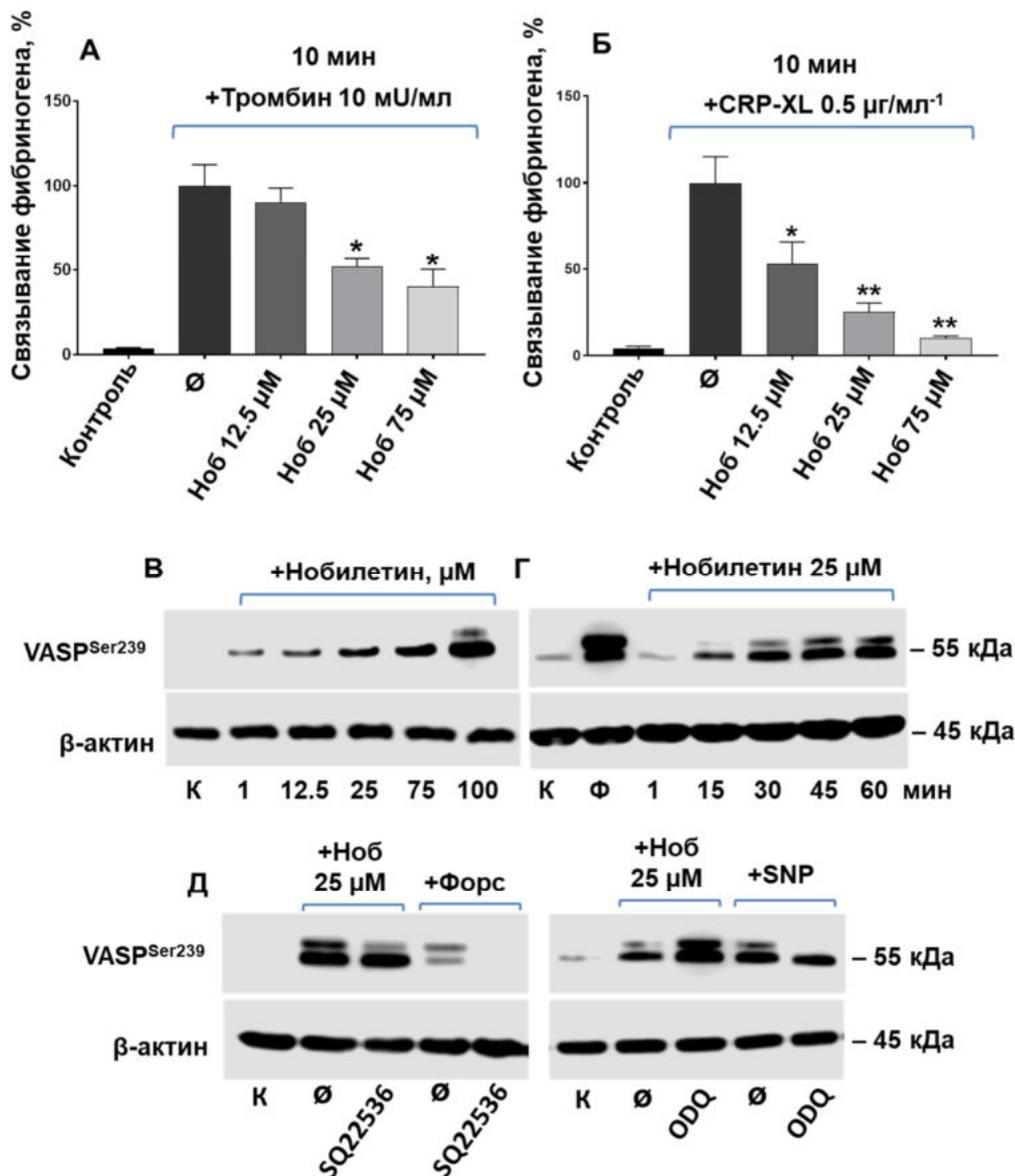


Рис. 3. Нобилетин блокирует активацию тромбоцитов за счёт запуска АЦ/цАМФ/РКА сигнального пути.

(А, Б) В отмытые тромбоциты (1×10^8 /мл) добавляли фибриноген, конъюгированный с Alexa-647 (15 μ г/мл, конечная концентрация) за 15 мин до активации и инкубировали с нобилетином в концентрациях 12.5, 25 и 75 μ М в течение 10 мин, далее добавляли тромбин или Crp-XL, инкубировали ещё 2 мин, после чего разбавляли пробы PBS буфером (1:40) и анализировали на проточном цитометре. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (SD). Активация интегринов α IIb β 3, вызванная тромбином или CRP-XL (\emptyset), принята за 100%, $n = 6$, * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем, ** – $p < 0.01$ по сравнению с контролем. (В-Д) Отмытые тромбоциты (3×10^8 /мл) инкубировали с нобилетином (В) в указанных концентрациях и (Г) указанное время. Форсколин (Ф) использовали в качестве позитивного контроля. (Д) Тромбоциты инкубировали с SQ 22536 (100 μ М) или ODQ (20 μ М) в течение 10 мин, после чего вводили нобилетин и инкубировали еще 30 мин. Активность РКА/ПКГ определяли по

форфорилированию белка VASP. В качестве позитивного контроля использовали форсколин и SNP. Актин использовали для контроля количества белка. К – контроль.

циклину (PGI₂) и рецепторы EP₂ и EP₄ к PGE₂ [15]. Кроме того, активация АЦ может запускаться вследствие взаимодействия аденозина с аденозиновым рецептором A_{2A} на тромбоцитах [16]. Для того, чтобы определить, связано ли действие нобилетина на тромбоциты с воздействием на поверхностные рецепторы, в работе использовались ингибиторы упомянутых выше рецепторов. По степени фосфорилирования белка VASP удалось определить, что ингибиторы рецепторов IP (Cay10441), DP₁ (BW A868C) и EP₄ (L-161,982) не влияют на активацию АЦ/цАМФ/РКА сигнальной системы нобилетином, тогда как (Рис.4Б-Г), тогда как ингибитор рецептора A_{2A} (ZM 241385) блокирует действие нобилетина (рис. 4А).

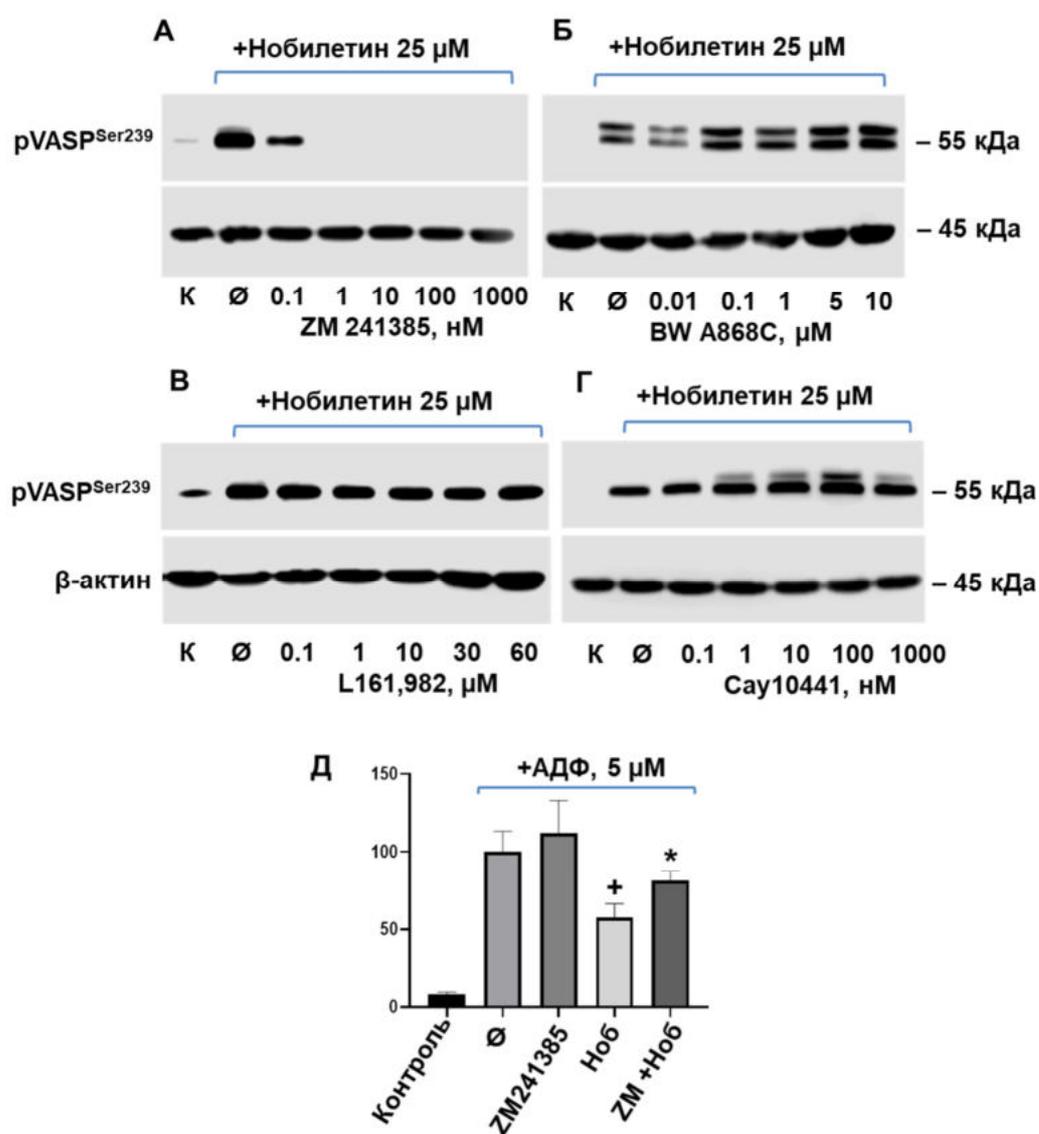


Рис. 4. Ингибирующее действие нобилетина на тромбоциты опосредовано активацией аденозинового рецептора A_{2A}.

Отмытые тромбоциты (3×10^8 /мл) инкубировали с ингибиторами рецепторов (А) ZM 241385, (Б) BW A868C, (В) L161,982 и (Г) Cay10441 в указанных концентрациях в течение 10 мин, после чего вводили нобилетин и инкубировали еще 30 мин. Актин использовали для контроля количества белка. (Д) В плазму, обогащенную тромбоцитами, добавляли фибриноген, конъюгированный с Alexa-647 (15 μ г/мл, конечная концентрация), инкубировали с ингибитором аденозинового A_{2A} -рецептора (ZM 241385) в течение 10 мин, после чего вводили нобилетин (50 μ М) и инкубировали еще 10 мин. Далее тромбоциты активировали АДФ (5 μ М, 5 мин) и анализировали на проточном цитометре. Данные представлены как среднее \pm SD. Активация интегринов α IIb β 3, вызванная ADP (\emptyset), принята за 100%, $n = 9$; $^+$ различия между ADP (\emptyset) и Ноб достоверны при $p < 0.01$, * – различия между Ноб и Ноб+ZM 241385 достоверны при $p < 0.01$. Ноб – нобилетин, К – контроль

Для того, чтобы убедиться, что ингибирующий эффект нобилетина действительно связан с действием на рецептор A_{2A} , было проверено, восстанавливает ли ZM 241385 активацию тромбоцитов после введения нобилетина. Для этого на проточном цитометре была проведена серия экспериментов по определению активации интегринов α IIb β 3, где было показано, что блокирование рецептора A_{2A} частично восстанавливало фибриногеновое связывание тромбоцитов, активированных АДФ, после введения нобилетина (Рис. 4Д). При этом совместное введение ZM 241385 и АДФ вызывало небольшое потенцирование активации ($11.8 \pm 7.01\%$), которое может наблюдаться вследствие снижения базальной активации АЦ после блокады рецептора A_{2A} . Эти данные служат подтверждением того, что основной ингибирующий эффект нобилетина на тромбоциты связан с активацией аденозинового рецептора A_{2A} на тромбоцитах.

3. Влияние куркумина на функциональную активность тромбоцитов

Куркумин относится к полифенольным соединениям, широко используемым в Азии в качестве специи и в традиционной медицине, которое выделяют из растения *Curcuma longa*. Так же как и для нобилетина для куркумина описано множество полезных активностей, среди которых присутствуют противоопухолевая [17, 18] и антитромбоцитарная [19]. Куркумин используется в противоопухолевой терапии как моноагент и в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами [20, 21]. Однако из-за низкой биологической доступности куркумин чаще всего используется в качестве адьюванта [22]. При этом установлено, что куркумин влияет на активность тромбоцитов путём модуляции цикло- и липоксигеназного сигнальных путей [23, 24], а также путём воздействия на киназу Syk, которая является ключевым белком в передаче сигнала от гликопротеиновых рецепторов [24]. Однако влияние куркумина на жизнеспособность тромбоцитов и активность РКА/РКГ ингибиторных систем не было изучено.

3.1 Куркумин блокирует активацию тромбоцитов и не вызывает их гибель

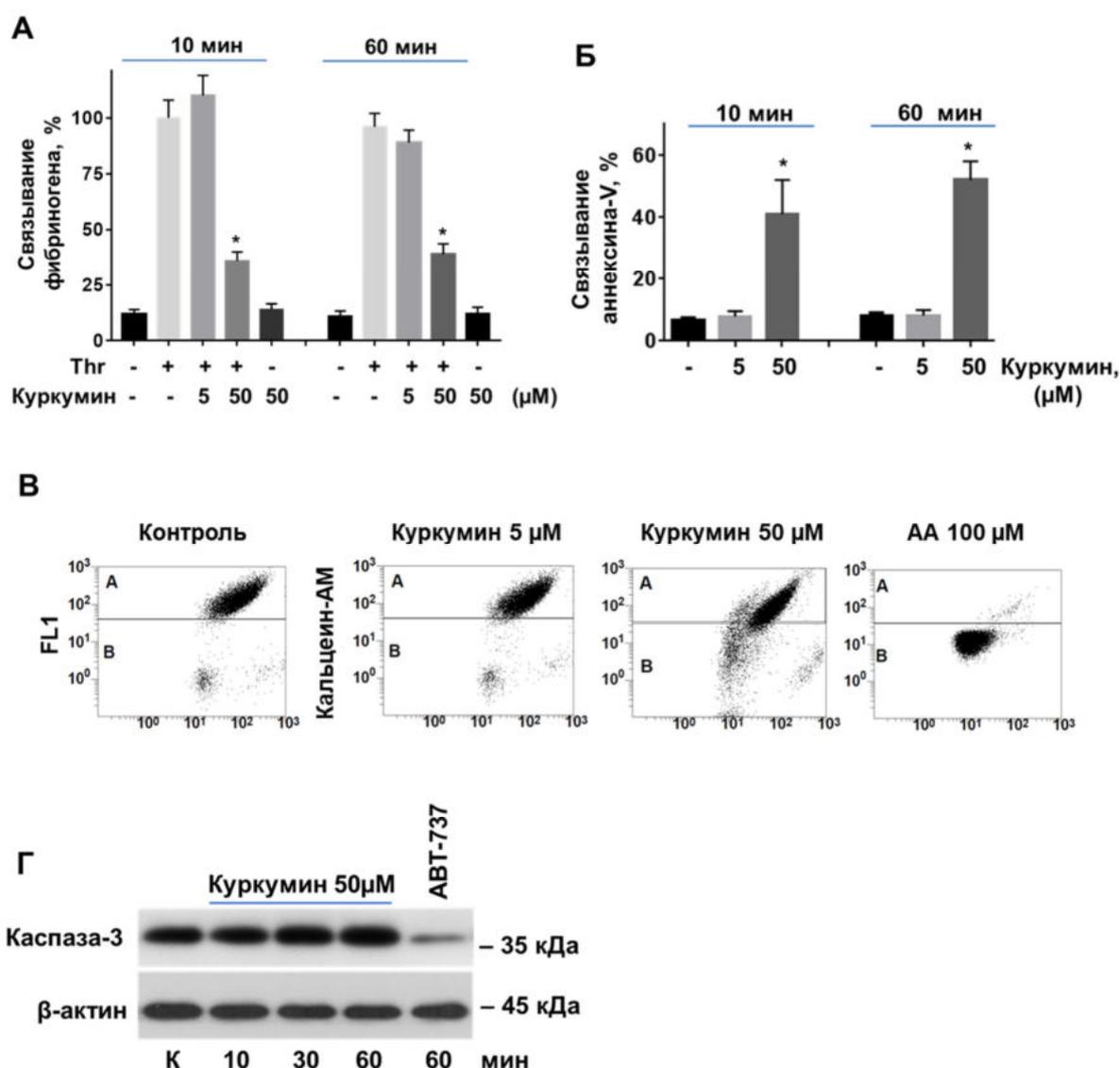


Рис. 5. Куркумин блокирует активацию тромбоцитов, вызванную тромбином, и не вызывает гибель тромбоцитов.

Отмытые тромбоциты (1×10^8 /мл для проточной цитометрии и 3×10^8 /мл для Вестерн блоттинга) инкубировали с куркумином в указанных концентрациях и (А) анализировали фибриногеновое связывание, (Б) уровень экстернализации фосфатидилсерина (PS) (В) активность внутриклеточных эстераз и (Г) определяли расщепление каспазы-3. (А) Анализ активации интегринов α IIb β 3 (связывание с фибриногеном-Alexa-647) проводился при помощи проточного цитометра. Фибриноген (15 μ г/мл, конечная концентрация) был добавлен за 15 мин до активации. (Б) Тромбоциты инкубировали с куркумином, затем добавляли аннексин-V (1:10) и аннексин-связывающий буфер (1:20), инкубировали 10 минут и анализировали при помощи проточного цитометра. (В) Тромбоциты инкубировали с кальцеином-AM (0.2 μ М, 30 мин), затем вводили куркумин и инкубировали ещё 60 мин. Далее пробы разбавляли в PBS буфере (1:40) и анализировали на проточном цитометре. По оси X представлена интенсивность флуоресценции, по оси Y

– гранулярность клеток. Значения представлены в логарифмической шкале. Поле «А» на каждом графике отражает кальцеин-АМ-позитивные тромбоциты, поле «В» отражает тромбоциты со сниженной интенсивностью флуоресценции кальцеин-АМ. $n = 6$. (Г) Вестерн блот анализ каспазы 3, АВТ-737 (1 μM , 60 мин) использовали как позитивный контроль. Актин использовали как контроль количества белка. К- контроль. (Д)

Прежде всего было проверено влияет ли куркумин на активацию тромбоцитов. В экспериментах по определению активности интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ было установлено, что куркумин блокирует активацию тромбоцитов, вызванную тромбином (Рис. 5А). При этом блокирование активации сопровождалось экстернализацией PS на тромбоцитах (Рис. 4Б). Поскольку экстернализация PS может быть признаком гибели тромбоцитов, было проверено влияние куркумина на активность внутриклеточных эстераз по степени флуоресценции кальцеина-АМ и на расщепление каспазы-3. Куркумин в низкой концентрации (5 μM) не вызывал снижение активности эстераз, тогда как в высокой концентрации (50 μM) только частично снижал флуоресценцию кальцеина-АМ (Рис. 4В). При этом куркумин не влиял на активность каспазы-3 в тромбоцитах, что свидетельствует об образовании прокоагулянтных тромбоцитов после воздействия куркумина, но не их гибели.

3.1 Действие куркумина на тромбоциты опосредовано активацией АЦ/цАМФ/РКА сигнального пути за счёт воздействия на рецептор A_{2A} к аденозину

Следующим шагом было проверено влияет ли куркумин на активность РКА/ПКГ сигнальных путей в тромбоцитах. Куркумин вызывал фосфорилирование белка VASP (Рис. 6А), что говорит об активации РКА или ПКГ в тромбоцитах. Использование ингибиторов АЦ и ГЦ позволило установить, что фосфорилирование VASP опосредовано активацией АЦ, но не ГЦ (Рис. 6Б). Далее, по аналогии с нобилетином, было исследовано, связана ли активность АЦ после введения куркумина с активацией поверхностных рецепторов на тромбоцитах. Для этого использовали ингибиторы простагландиновых рецепторов DP_1 (BW A868C), IP (Сау10441), EP_4 (L-161,982) и ингибитор аденозинового рецептора A_{2A} (ZM 241385). Оказалось, что фосфорилирование белка VASP по обоим Ser157 и Ser239 после введения куркумина, так же, как и в случае нобилетина, блокируется ингибитором аденозинового рецептора A_{2A} (Рис. 6В), но не ингибиторами простагландиновых рецепторов (Рис. 14Г-Е). Исходя из этих данных, был сделан вывод о том, что ингибирующее действие куркумина на тромбоциты, по крайней мере частично, опосредовано активацией аденозинового рецептора A_{2A} .

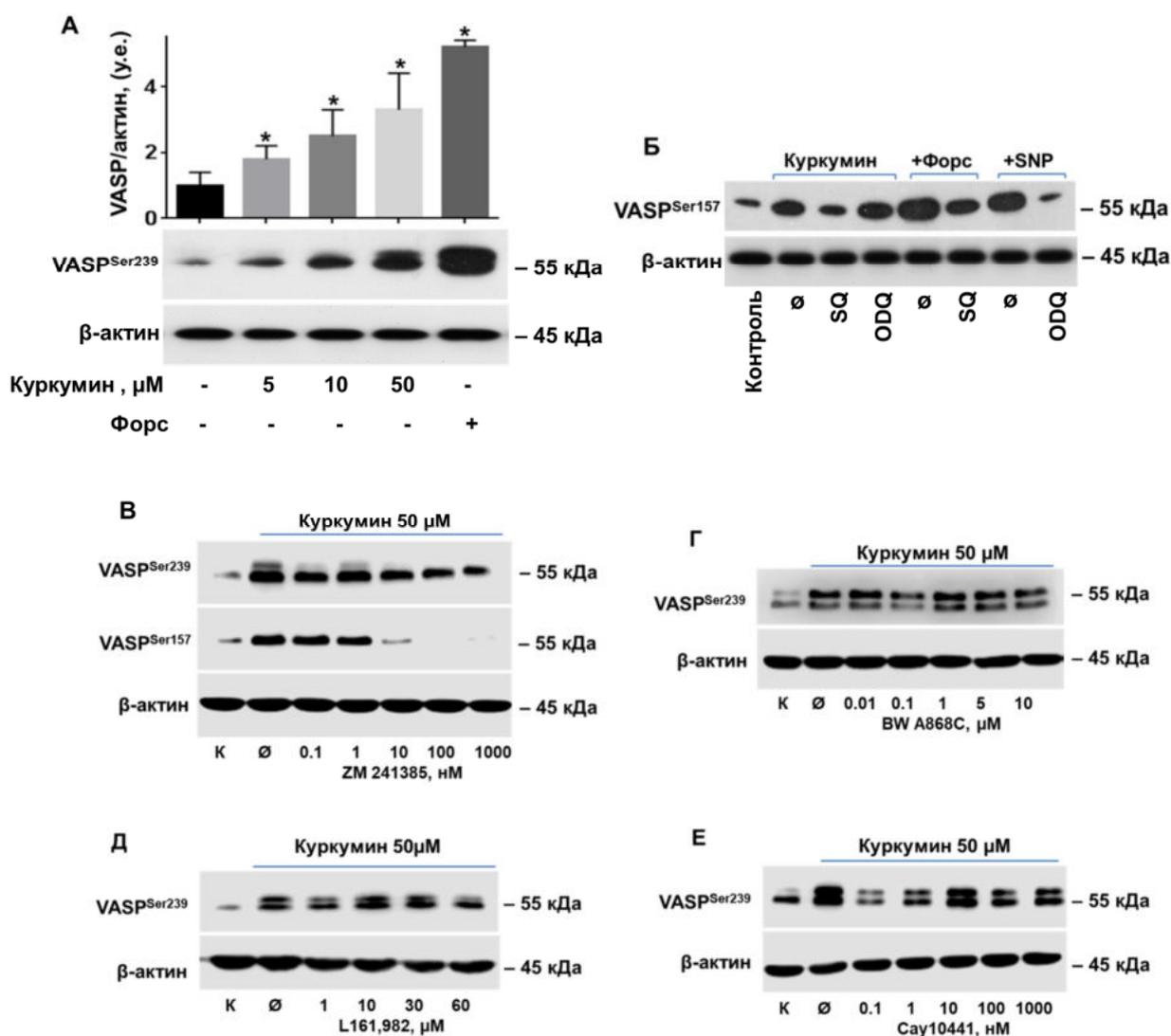


Рис. 6. Куркумин вызывает цАМФ-зависимую активацию PKA в тромбоцитах.

Отмытые тромбоциты ($3 \times 10^8/\text{мл}$) (А) инкубировали с указанными концентрациями куркумина в течение 15 мин и анализировали при помощи Вестерн блоттинга фосфорилирование VASP по Ser239. Интенсивность сигнала была нормализована сигналом от актина. Для каждого образца это соотношение выражено в условных единицах (у.е.) по отношению к контролю, принятому за 1. Данные представлены как среднее \pm SD. * – $p \leq 0,05$, $n = 4$. (Б) Репрезентативный блоты фосфорилирования VASP. Тромбоциты преинкубировали с (Б) ингибитором АЦ SQ22536 (SQ, 100 μM) или с ингибитором ГЦ ODQ (20 μM) в течение 10 мин, (В) ZM 241385, (Г) BW A868C, (Д) L161,982 и (Е) Cay10441 в указанных концентрациях, затем вводили куркумин (50 μM) и инкубировали ещё 15 мин, после чего анализировали фосфорилирование белка VASP по Ser157 и Ser239 при помощи вестерн блоттинга. Актин использовали для контроля количества белка.

4. Влияние ресвератрола на функциональную активность тромбоцитов

Ресвератрол по своей химической структуре относится к стильбенам и выделяется из ягод, арахиса, винограда и некоторых других компонентов растений [25]. Ресвератрол обладает множеством полезных свойств, среди которых описаны противоопухолевая и антитромбоцитарная активности [26]. Показано влияние ресвератрола на рост, клеточный цикл и апоптоз опухолевых клеток [27]. При этом ресвератрол может модулировать активность тромбоцитов путём воздействия на циклооксигеназный (COX-1) и липоксигеназный (12-LOX) сигнальные пути в тромбоцитах [28]. Однако влияние ресвератрола на другие ингибирующие сигнальные пути не было изучено.

4.1 Ресвератрол блокирует активацию тромбоцитов и не влияет на активность PKA/PKG сигнальных систем

Анализ активности интегринов $\alpha IIb\beta 3$ позволил установить, что ресвератрол дозозависимо блокировал активацию тромбоцитов, вызванную агонистами тромбином или Ctp-XL (Рис. 7А, Б). При помощи анализа фосфорилирования белка VASP методом вестерн блоттинга было установлено, что действие ресвератрола на тромбоциты не связано с активацией ингибирующих PKA/PKG сигнальных систем (Рис. 7В).

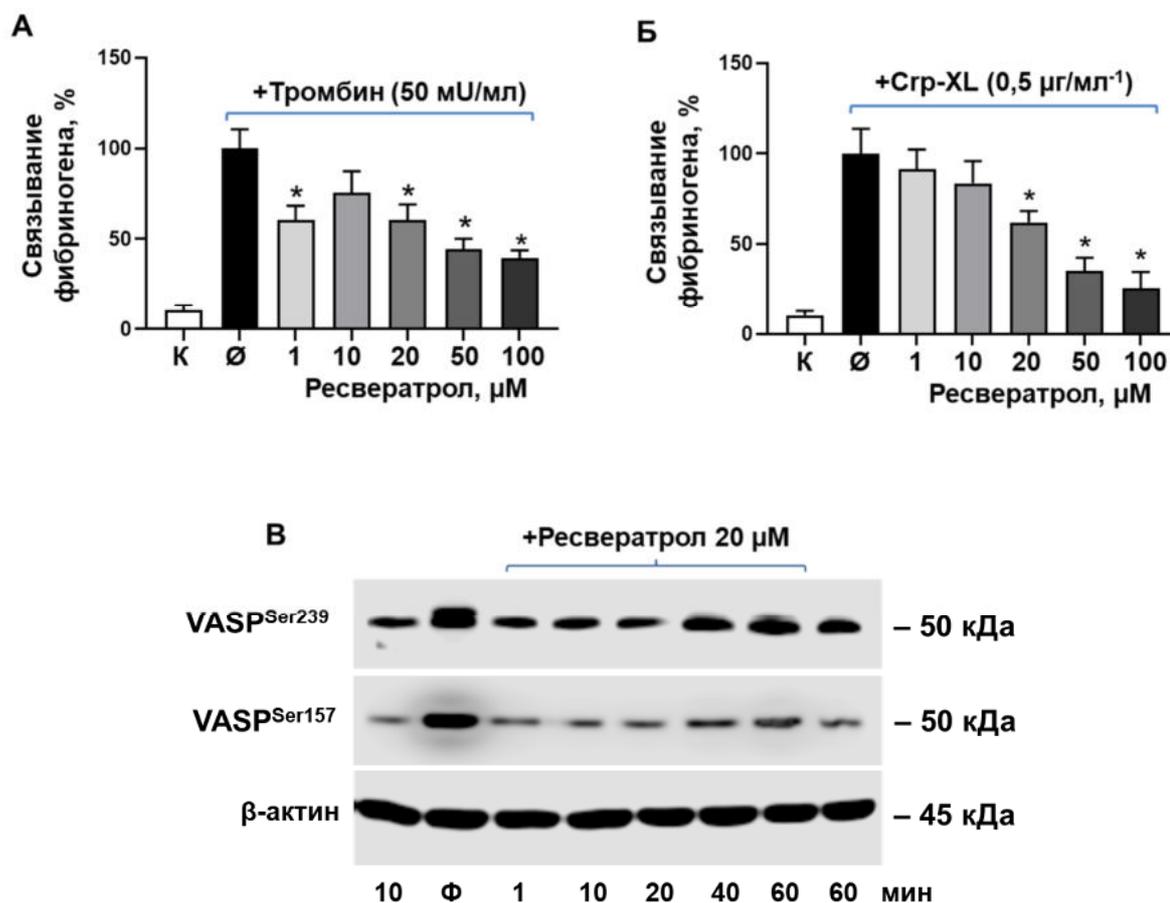


Рис. 7. Ресвератрол ингибирует тромбин- и CRP-XL опосредованную активацию тромбоцитов и не влияет на активность PKA/PKG сигнальных систем.

(А, Б) В отмытые тромбоциты (1×10^8 /мл) добавляли фибриноген, конъюгированный с Alexa-647 (15 μ г/мл, конечная концентрация) за 15 мин до активации и инкубировали с ресвератролом в указанных концентрациях в течение 10 мин, далее добавляли тромбин или Crp-XL (\emptyset), инкубировали ещё 2 мин, после чего разбавляли пробы PBS буфером (1:40) и анализировали на проточном цитометре. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (SD). Активация интегринов α IIb β 3, вызванная тромбином или CRP-XL (\emptyset), принята за 100%, $n = 6$, * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем. (В) Отмытые тромбоциты (3×10^8 /мл) инкубировали с ресвератролом (20 μ М) в течение указанного времени, после чего анализировали фосфорилирование белка VASP по Ser157 и Ser239 при помощи вестерн блоттинга. В качестве позитивного контроля использовали форсколин (Φ) (5 μ М, 2 мин). Актин использовали для контроля количества белка. $n=4$.

4.2 Ресвератрол не влияет на жизнеспособность тромбоцитов

Поскольку ингибирование активации тромбоцитов может быть связано с образованием прокоагулянтных тромбоцитов или с их апоптозом, было проверено, влияет ли ресвератрол на жизнеспособность тромбоцитов. Для этого проверили, вызывает ли ресвератрол экстернализацию PS на тромбоцитах и расщепление каспазы-3.

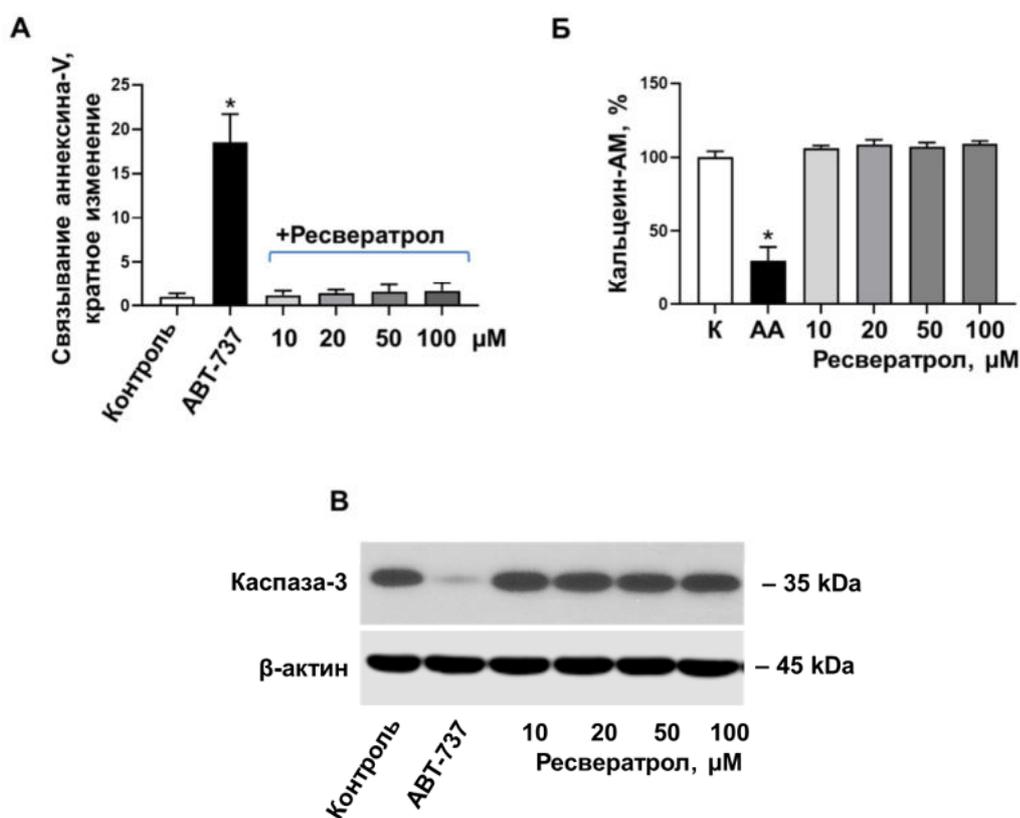


Рис. 19. Ресвератрол не влияет на жизнеспособность тромбоцитов.

Отмытые тромбоциты ($1 \times 10^8/\text{мл}$) (А) инкубировали с ресвератролом в указанных концентрациях в течение 15 мин, после чего анализировали на проточном цитометре. Активатор апоптоза АВТ-737 ($1 \mu\text{M}$, 60 мин) использовали в качестве позитивного контроля. Уровень экстернализации PS оценивался по степени связывания с аннексином V-PE. Данные представлены как среднее \pm SD, $n = 6$, * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем, принятым за 1. (Б) Тромбоциты инкубировали с ресвератролом в указанных концентрациях в течение 15 мин, после чего анализировали на проточном цитометре. Арахидоновую кислоту (АА, $10 \mu\text{M}$, 5 мин) использовали в качестве позитивного контроля. Уровень жизнеспособности тромбоцитов оценивался по степени флуоресценции кальцеина-АМ ($0.2 \mu\text{M}$). Данные представлены как среднее \pm SD, $n = 6$, * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем, принятым за 100 %. (В) Вестерн-блот каспазы 3. Отмытые тромбоциты ($3 \times 10^8/\text{мл}$) инкубировали с ресвератролом в указанных концентрациях, после чего анализировали при помощи вестерн блоттинга. и активатором апоптоза АВТ-737 ($1 \mu\text{M}$, 60 мин) использовали как позитивный контроль. Актин использовали для контроля количества белка.

Оказалось, что ресвератрол не влияет на активность каспазы-3 (Рис. 8В) и экстернализацию PS (Рис. 8А). При этом также не снижалась флуоресценция кальцеин-АМ после введения ресвератрола (Рис. 8Б), что свидетельствует о том, что ресвератрол не влияет на жизнеспособность тромбоцитов.

4.3 Ресвератрол блокирует образование реактивных форм кислорода в тромбоцитах

Образование реактивных форм кислорода (ROS) играет важную роль в процессах активации и агрегации тромбоцитов [29]. Поскольку для ресвератрола описана выраженная антиоксидантная активность, было проверено, влияет ли это соединение на образование ROS при активации тромбоцитов различными агонистами.

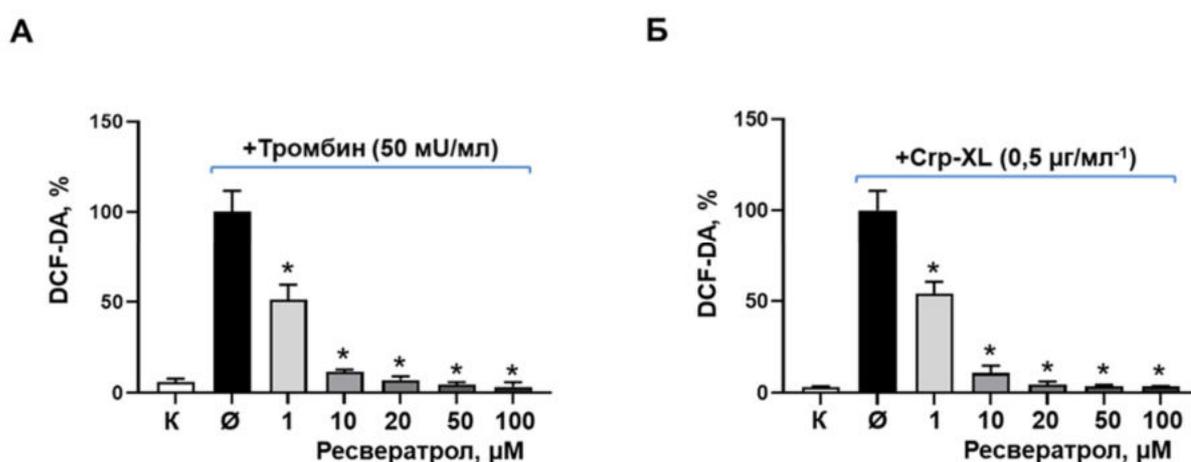


Рис. 9. Ресвератрол блокирует образование реактивных форм кислорода в тромбоцитах при активации.

Отмытые тромбоциты ($1 \times 10^8/\text{мл}$) инкубировали с ресвератролом в указанных концентрациях и DCF-DA ($10 \mu\text{M}$) в течение 30 мин, затем активировали (А) тромбином ($50 \text{ мU}/\text{мл}$, 2 мин) или (Б) Ctp-XL ($0,5 \mu\text{г}/\text{мл}^{-1}$) после чего реакцию останавливали разбавлением в PBS буфере (1:40). Данные представлены как среднее \pm SD, значение контроля было принято за 100%. $n = 6$; * – $p < 0.05$ по сравнению с тромбином или Ctp-XL (\emptyset), $n = 6$.

Для этого использовали краситель DCF-DA, который приобретает флуоресцентные свойства после окисления, индуцированного ROS. Ресвератрол блокировал образование ROS в тромбоцитах, активированных тромбином (Рис. 8А) или Ctp-XL (Рис. 8Б), причем значимое блокирование наблюдалось даже при введении самых низких доз ($1 \mu\text{M}$) ресвератрола. Исходя из этих данных, был сделан вывод о том, что основной ингибирующий эффект ресвератрола на тромбоциты связан с его антиоксидантной активностью и блокированием ROS в тромбоцитах.

5. Влияние ML355 на функциональную активность тромбоцитов

Фермент 12-LOX участвует в метаболизме арахидоновой кислоты и катализирует образование метаболита 12(S)- гидропероксиикоса-5,8,10,14-тетраеновой кислоты (12-HpETE), который очень быстро метаболизируется глутатионовыми пероксидазами до 12-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты (12(S)-HETE) [30]. Метаболиты, образующиеся вследствие активности 12-LOX, играют важную роль в активации тромбоцитов [31, 32] и ингибирование этого белка снижает агрегационную активность тромбоцитов [33]. Помимо этого, гиперэкспрессия 12-LOX часто наблюдается в опухолевых клетках различного происхождения [34, 35] и связана с прогрессией опухоли и опухолевым ангиогенезом, а ингибирование 12-LOX приводит к апоптозу раковых клеток и блокированию их пролиферации [36]. В связи с этим 12-LOX рассматривается в качестве мишени в противоопухолевой терапии [37, 38]. Однако изучение 12-LOX и её роли в метаболизме тромбоцитов и опухолевых клеток недостаточно изучена из-за неспецифического действия существующих 12-LOX ингибиторов. Появление соединения ML355, которое селективно ингибирует 12-LOX, позволяет ближе подойти к изучению роли 12-LOX в процессах активации тромбоцитов и участии этого белка в развитии опухолей. Однако молекулярные механизмы действия этого соединения на тромбоциты не были изучены.

5.1 ML355 блокирует активацию тромбоцитов, вызванную тромбином или TxA₂, но не Ctp-XL

В одной из работ было показано, что ML355 может снижать агрегацию тромбоцитов [39], поэтому было исследовано действие этого соединения на активацию

тромбоцитов, вызванную различными агонистами. Анализ активности интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ по связыванию с меченым фибриногеном позволил установить, что ML355 вызывает снижение активации тромбоцитов после введения тромбина или TxA2 (U46619), но не Cpr-XL (Рис. 10А-В). При этом ингибирующая активность ML355 возрастала со временем инкубации, и значимое блокирование фибриногенового связывания наблюдалось только через 30 мин после введения ML355 (Рис. 10Г).

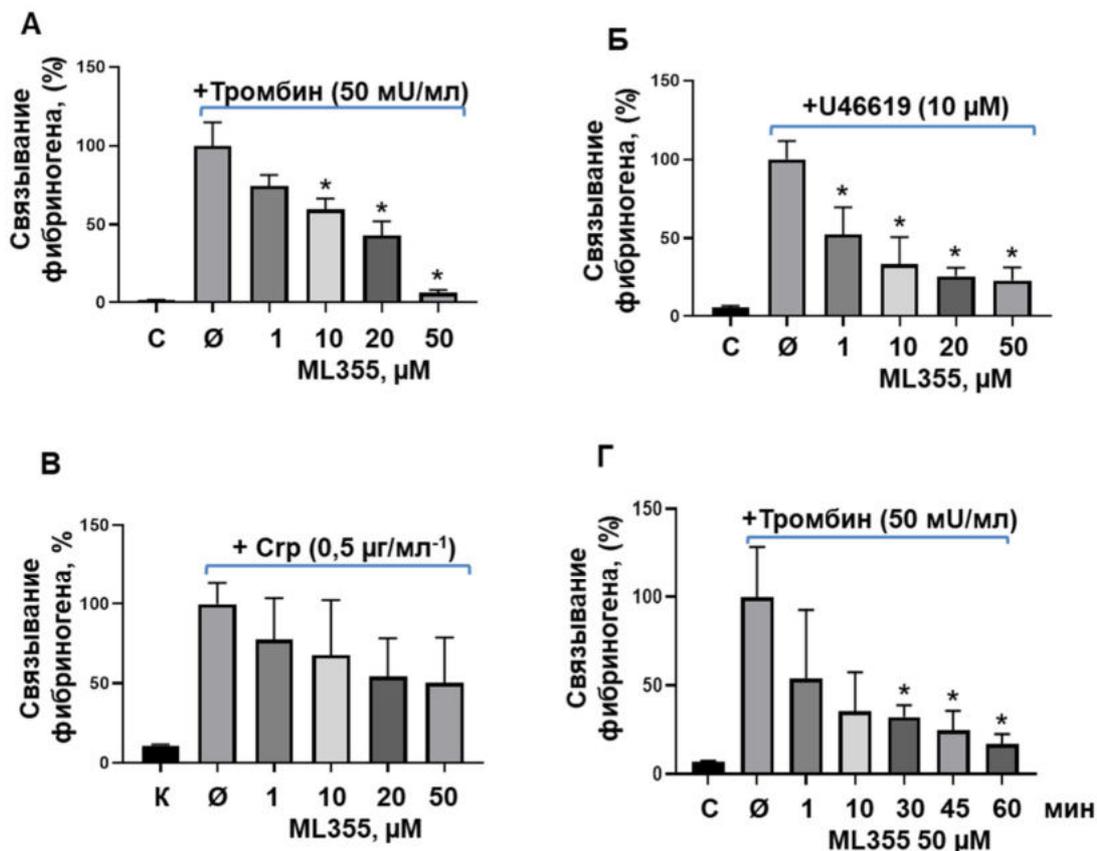


Рис. 10. ML355 блокирует тромбин- или U46619-, но не Cpr-XL-индуцированную активацию тромбоцитов.

Отмытые тромбоциты ($1 \times 10^8/\text{мл}$) инкубировали с ML355 (А-В) в указанных концентрациях и (Г) указанное время (50 μM) и затем активировали тромбином (50 мU/мл, 2 мин) U46619 (1 μM , 2 мин) или (Cpr-XL 0,5 $\mu\text{g}/\text{мл}^{-1}$, 2 мин). Анализ активации интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (связывание с фибриногеном-Alexa-647) проводился при помощи проточного цитометра. Фибриноген (15 $\mu\text{g}/\text{мл}$, конечная концентрация) был добавлен за 15 мин до активации. Для анализа на проточном цитометре пробы разбавлялись PBS буфером (1:40). Данные представлены как среднее \pm SD. Активация, вызванная тромбином, U46619 или Cpr-XL (Ø), принята за 100%, $n = 9$; * – по сравнению с позитивным контролем (тромбином, U46619 или Cpr-XL), $p < 0.05$.

Анализ фосфорилирования белков PI3K, Erk1/2, Akt, p38 и Syk, участвующих в активации тромбоцитов, позволил установить, что ML355 блокирует фосфорилирование белков PI3K, Erk1/2 и Akt, но не p38 и Syk (Рис.11А-В). Эти данные могут объяснить

отсутствие ингибирующего влияния ML355 на активацию тромбоцитов, индуцированную Crp-XL, поскольку Syk является основной киназой в пути передачи активационного сигнала от рецептора GPVI. Более того, ML355 в больших дозах даже потенцировал фосфорилирование Syk после введения Crp-XL (Рис. 11В), однако сам по себе не влиял на базальное фосфорилирование Syk (Рис. 11Г)

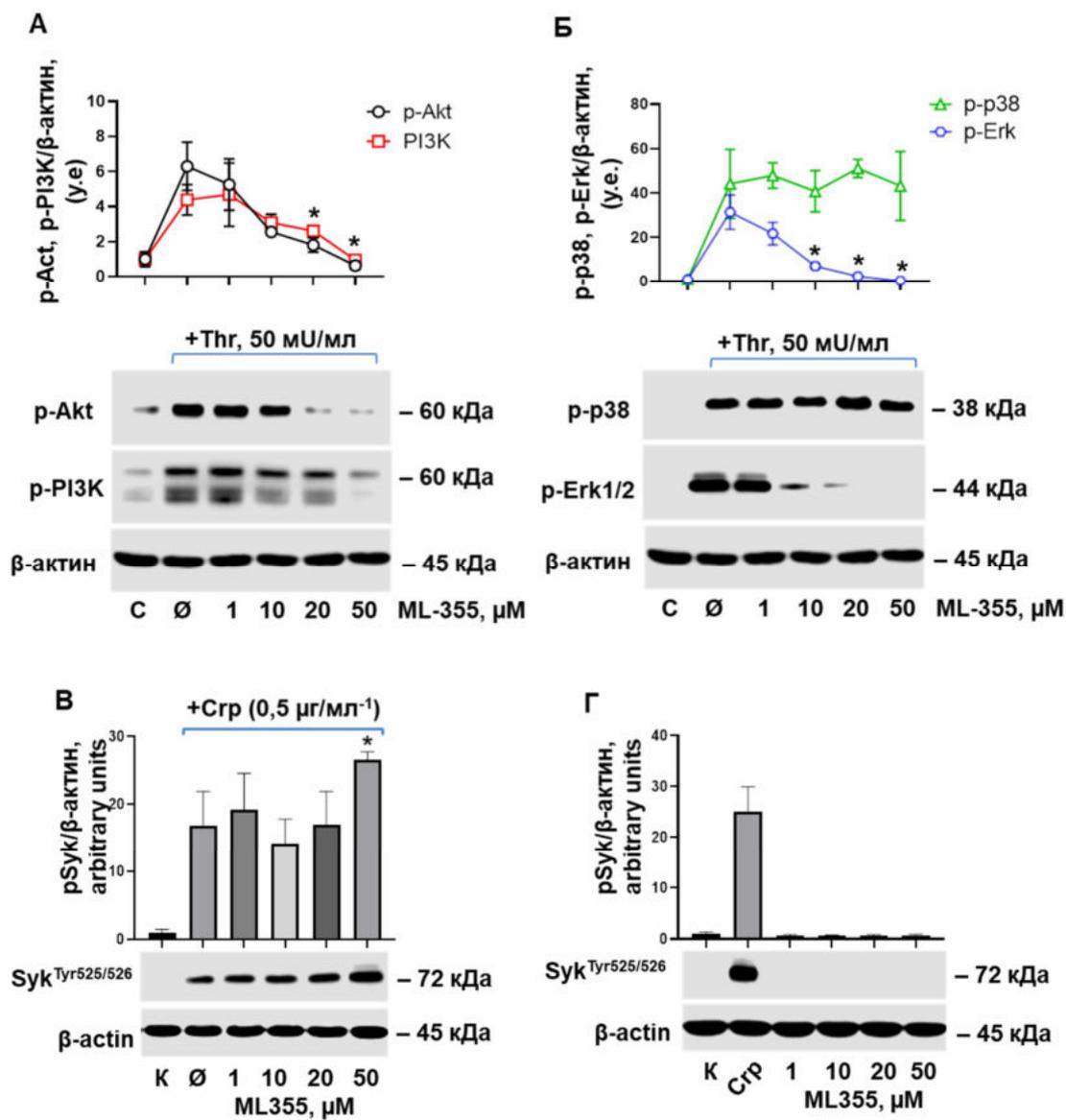


Рис. 11. ML355 блокирует фосфорилирование белков Akt, PI3K и ERK, но не p38 и Syk.

Отмытые тромбоциты (3×10^8 /мл) инкубировали с ML355 в указанных концентрациях в течение 30 мин и затем активировали тромбином (Thr, 50 мУ/мл, 2 мин), после чего анализировали при помощи Вестерн блоттинга. Актин использовали как контроль количества белка. (А, Б) Количественный анализ фосфорилирования белков Akt, PI3K, ERK и p38. Интенсивность сигнала была нормализована сигналом от актина. Данные представлены как среднее \pm SD. Для каждого образца это соотношение выражено в

условных единицах (у.е.) по отношению к контролю, принятому за 1. (В, Г) Репрезентативные блоты четырех независимых экспериментов.

5.2 ML355 блокирует образование ROS в активированных тромбоцитах

Поскольку ингибиторы 12-LOX обладают выраженными антиоксидантными свойствами [40, 41], было проверено, влияет ли ML355 на уровень ROS в активированных тромбоцитах. Для этого использовали тот же краситель DCF-DA, что и в случае с ресвератролом. ML355 вызывал снижение уровня ROS в тромбоцитах, активированных тромбином (Рис. 12). При этом ML355 в концентрации 50 μM возвращал уровень флуоресценции DCF-DA к контрольным значениям

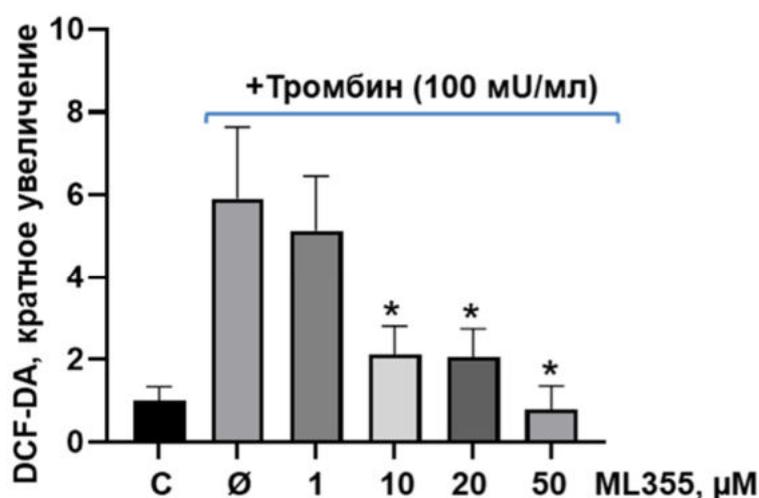


Рис. 12. ML355 блокирует образование реактивных форм кислорода (ROS) в тромбоцитах.

Отмытые тромбоциты ($1 \times 10^8/\text{мл}$) инкубировали с ML355 в указанных концентрациях и DCF-DA ($10 \mu\text{M}$) в течение 30 мин, затем активировали тромбином (50 мУ/мл , 2 мин), после чего реакцию останавливали разбавлением в PBS буфере (1:40). Данные представлены как среднее \pm SD, значение контроля было принято за 1. $n = 6$; * – $p < 0.05$ по сравнению с тромбином (Ø), $n = 8$.

5.3 ML355 вызывает цАМФ-зависимое фосфорилирование VASP в тромбоцитах

Для того чтобы определить связан ли ингибирующий эффект ML355 на тромбоциты с активацией АЦ/цАМФ/РКА или ГЦ/цГМФ/РКГ сигнальных путей, был проанализирован уровень фосфорилирования VASP после введения ML355. Оказалось, что высокая доза ML355 ($50 \mu\text{M}$) вызывает фосфорилирование VASP (Рис. 13А). Для того чтобы определить, связано ли это фосфорилирование с активацией РКА/РКГ

ингибирующих сигнальных путей, использовали ингибиторы АЦ SQ22536 и ГЦ ODQ. Фосфорилирование VASP, вызванное ML355, блокировалось ингибитором АЦ, но не ингибитором ГЦ (Рис 13Б, В), что свидетельствует об активации АЦ в тромбоцитах после введения высоких доз ML355. Исходя из этих данные можно сделать вывод о том, что ингибирующее действие ML355 в низких дозах связано с блокированием образования ROS, тогда как высокие концентрации ML355 могут вызвать активацию АЦ/цАМФ/РКА сигнальной системы в тромбоцитах.

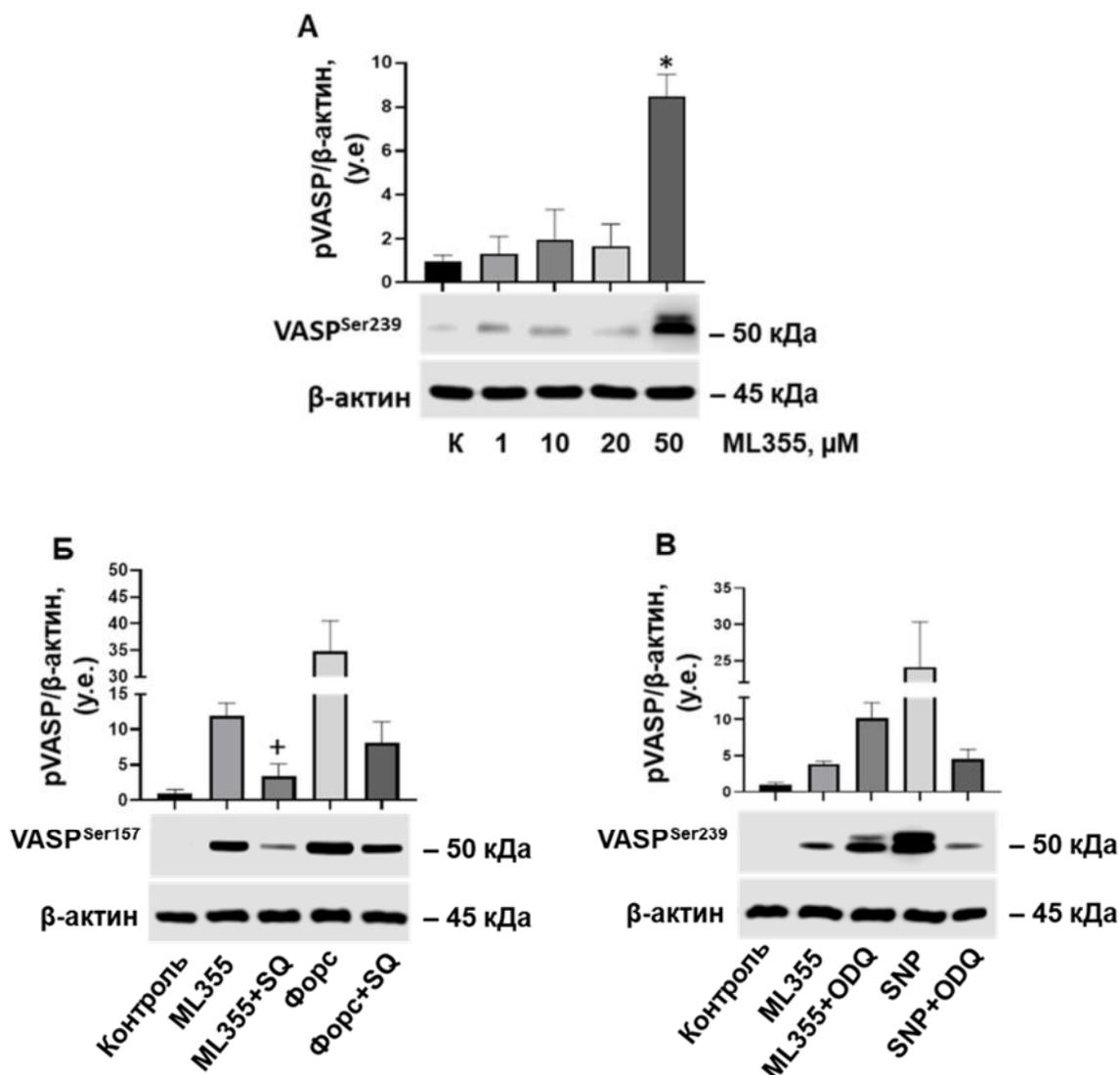


Рис. 13. ML355 активирует АС/сАМФ/РКА ингибиторную систему в тромбоцитах.

(А) Отмытые тромбоциты ($3 \times 10^8/\text{мл}$) инкубировали с ML355 в указанных концентрациях в течение 30 мин и затем анализировали при помощи Вестерн блоттинга. (Б, В) Отмытые тромбоциты ($3 \times 10^8/\text{мл}$) преинкубировали с ODQ (20 μM) или SQ22563 (SQ, 100 μM) в течение 10 мин, затем добавляли ML355 (50 μM) и инкубировали ещё 30 мин. SNP (1 μM) и форсколин (Форс, 1 μM) использовали в качестве позитивного контроля. Актин использовали как контроль количества белка. Интенсивность сигнала была

нормализована сигналом от актина. Для каждого образца это соотношение выражено в условных единицах (у.е.) по отношению к контролю, принятому за 1. Данные представлены как среднее \pm SD. * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем, + – $p \leq 0,05$ по сравнению с ML355, $n = 4$. К – контроль.

ВЫВОДЫ

1. Высокоаффинные ингибиторы белка VCL-X_L АВТ-737 и WENI-539 вызывают апоптоз тромбоцитов и блокируют их активацию за счёт каспаз-зависимой активации РКА.
2. Низкоаффинные ингибиторы белка VCL-X_L обатоклакс и госсипол блокируют активацию тромбоцитов и вызывают их гибель каспаз-независимым путём.
3. Ингибирующее действие нобилетина на тромбоциты опосредовано активацией рецептора A_{2A} к аденозину и запуском АЦ/цАМФ/РКА сигнального пути в тромбоцитах.
4. Куркумин вызывает образование прокоагулянтных тромбоцитов и блокирует их активацию через воздействие на аденозиновый рецептор A_{2A}, что приводит к запуску АЦ/цАМФ/РКА сигнального пути.
5. Ресвератрол блокирует активацию тромбоцитов, вызванную различными агонистами, за счёт снижения уровня ROS.
6. ML355 блокирует тромбин- или ТхА2-индуцированную активацию тромбоцитов, но не влияет на активацию тромбоцитов, вызванную C₁p-XL. Основной ингибирующий эффект ML355 в низких дозах опосредован снижением уровня ROS в тромбоцитах, тогда как ML355 в высокой дозе вызывает активацию ингибиторного АЦ/цАМФ/РКА сигнального пути.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи по теме диссертации:

1. Rukoyatkina N., **Shpakova V.**, Panteleev M., Kharazova A., Gambaryan S., Geiger J. Multifaceted effects of arachidonic acid and interaction with cyclic nucleotides in human platelets. *Thromb Res.* 2018. V.171. P. 22 - 30.
2. **Шпакова В. С.**, Гамбарян С. П., Рукояткина Н. И., Кривченко А. И. Высокоаффинный ингибитор белка VCL-XL активирует протеинкиназу а в

тромбоцитах и блокирует их активацию. СПб.: Российский физиологический журнал. 2018. Т. 104. № 9.

3. Гамбарян С. П., **Шпакова В. С.** NO/цГМФ сигнальный путь в тромбоцитах. Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2019. Т. 105. № 8. С. 933–953.
4. **Шпакова В. С.**, Гамбарян С. П. Роль тромбоцитов в онкологических заболеваниях. Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2020. Т. 106. № 10. С. 1209–1237.
5. Rukoyatkina N., **Shpakova V.**, Sudnitsyna J., Panteleev M., Makhoul S., Gambaryan S., Jurk K. Curcumin at Low Doses Potentiates and at High Doses Inhibits ABT-737-Induced Platelet Apoptosis. Int. J. Mol. Sci. 2021. 22(10). P. 5405.
6. **Шпакова В.С.**, Авдеева А.В., Аль Араве Н., Прилепская А.М., Гамбарян С.П., Алексеева Е. С., Рукояткина Н.И.. Антитромбоцитарный эффект нобилетина опосредован активацией аденозинового рецептора A_{2A}. Биологические мембраны. 2021. Т. 38. № 6. С. 1-10.

Тезисы конференций:

1. **Шпакова В.С.**, Кривченко А.И., Пантелеев М.А., Гамбарян С.П., Рукояткина Н.И. Ингибиторы VCL-2 белков, вызывающие апоптоз в тромбоцитах, блокируют их активацию. Гематология и трансфузиология. Т. 63. № 1 (прил.1). М.: Медицина. 2018. с. 197.
2. **Шпакова В.С.**, Баскаков А.В, Рукояткина Н.И. Механизм действия противоопухолевых препаратов, ингибирующих VCL-2 белки, на функциональную активность тромбоцитов. Актуальные проблемы биомедицины – 2018: Материалы XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 12-13 апреля 2018 г. СПб.: РИЦ ПСПбГМУ. 2018. С. 261.
3. **Шпакова В.С.** Механизм блокирования активации тромбоцитов после воздействия ингибиторов антиапоптотических VCL2 белков. Тезисы всероссийской молодежной медицинской конференции с международным участием «Алмазовские чтения – 2018», СПб.: Трансляционная медицина. Приложение № 3. 2018. С. 148.
4. **Шпакова В.С.**, Гамбарян С.П., Рукояткина Н.И. Влияние арахидоновой кислоты на функции тромбоцитов. Пущино: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. 2019. Т. 1. С. 123-127.

5. **Shpakova V.S.**, Gambaryan S.P., Rukoyatkina N.I. Inhibitors with high affinity to BCL-XL protein cause protein kinase A activation in caspase-3-dependent manner in platelets. Cell Death Discovery. Selected abstracts from the 26th Conference of the European Cell Death Organization (ECDO): Cell death in disease – from small molecules to translational medicine. 2019. Vol. 5. P.10.
6. Rukoyatkina N., **Shpakova V.**, Walter U., Jurk K., Gambaryan S. Activation of PKA/PKG inhibit procoagulant platelet formation but not caspase-dependent platelet apoptosis. Journal of Translation Medicine. Meeting abstracts from thr 9th International Conference on cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications. 2019.Vol. 17. Supplement 2. P. 32.
7. **Шпакова В.С.**, Гамбарян С.П., Рукояткина Н.И.. Противоопухолевые препараты, ингибирующие BCL-2 белки, каспаз-зависимым путём активируют ПКА в тромбоцитах. II объединённый научный форум. VI съезд физиологов СНГ. VI съезд биохимиков России. IX Российский симпозиум «Белки и пептиды». Научные труды. М: Acta Naturae. Спецвыпуск. Т. 1. С. 70
8. Авдеева А.В., **Шпакова В.С.**, Рукояткина Н.И. Нобилетин блокирует активацию тромбоцитов. Актуальные проблемы биомедицины – 2020: Сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 26-27 марта 2020 г. СПб.: РИЦ ПСПбГМУ. 2020. С. 211-212.
9. **Шпакова В.С.**, Рукояткина Н.И. ML355 блокирует активацию и апоптоз тромбоцитов. Тезисы Алмазовского молодёжного медицинского форума – 2020. СПб: Трансляционная медицина Приложение № 1. 2020. С. 229.
10. **Shpakova V.**, Gambaryan S., Rukoyatkina N.. ML355 Inhibits Platelets via GC Activation and Blocks Caspase-Dependent Apoptosis in Platelets. Res. Pract. Thromb. Haemost. 2020. Vol. 4. Supplement 1. <https://abstracts.isth.org/abstract/ml355-inhibits-platelets-via-gc-activation-and-blocks-caspase-dependent-apoptosis-in-platelets/>
11. Rukoyatkina N., **Shpakova V.**, Gambaryan S.. Modulation of ABT-737 Induced Platelet Apoptosis by Curcumin. Res. Pract. Thromb. Haemost. 2020. Vol. 4. Supplement 1. <https://abstracts.isth.org/abstract/modulation-of-abt-737-induced-platelet-apoptosis-by-curcumin/>
12. **Шпакова В.С.**, Авдеева А.В., Аль Араве Н., Прилепская А.М., Гамбарян С.П., Алексеева Е., Рукояткина Н.И. Антитромбоцитарный эффект нобилетина опосредован активацией аденозинового A_{2A} рецептора. Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Пушкино: Сборник статей. 2021. Т. 1. С. 725-732.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Debbie Jiang M. D., Alfred Ian Lee M. D., Thrombotic Risk from Chemotherapy and Other Cancer Therapies // *Cancer Treat Res.* 2019. V. 179. P. 87-101.
2. Mones J. V., Soff G., Management of Thrombocytopenia in Cancer Patients // *Cancer Treat Res.* 2019. V. 179. P. 139-150.
3. Zhang H., Nimmer P. M., Tahir S. K., Chen J., Fryer R. M., Hahn K. R., Iciek L. A., Morgan S. J., Nasarre M. C., Nelson R., Preusser L. C., Reinhart G. A., Smith M. L., Rosenberg S. H., Elmore S. W., Tse C., Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival // *Cell Death Differ.* 2007. V. 14 (5). P. 943-951.
4. Vogler M., Hamali H. A., Sun X. M., Bampton E. T., Dinsdale D., Snowden R. T., Dyer M. J., Goodall A. H., Cohen G. M., BCL2/BCL-X(L) inhibition induces apoptosis, disrupts cellular calcium homeostasis, and prevents platelet activation // *Blood.* 2011. V. 117 (26). P. 7145-7154.
5. Bodur C., Basaga H., Bcl-2 inhibitors: emerging drugs in cancer therapy // *Curr Med Chem.* 2012. V. 19 (12). P. 1804-1820.
6. Smolenski A., Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets // *J Thromb Haemost.* 2012. V. 10 (2). P. 167-176.
7. Eigenthaler M., Nolte C., Halbrugge M., Walter U., Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells // *Eur J Biochem.* 1992. V. 205 (2). P. 471-481.
8. Smolenski A., Bachmann C., Reinhard K., Honig-Liedl P., Jarchau T., Hoschuetzky H., Walter U., Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody // *J Biol Chem.* 1998. V. 273 (32). P. 20029-20035.
9. Burkhart J. M., Vaudel M., Gambaryan S., Radau S., Walter U., Martens L., Geiger J., Sickmann A., Zahedi R. P., The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways // *Blood.* 2012. V. 120 (15). P. e73-82.
10. Wang X. J., Cao Q., Zhang Y., Su X. D., Activation and regulation of caspase-6 and its role in neurodegenerative diseases // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015. V. 55. P. 553-572.

11. Hsiao P. C., Lee W. J., Yang S. F., Tan P., Chen H. Y., Lee L. M., Chang J. L., Lai G. M., Chow J. M., Chien M. H., Nobiletin suppresses the proliferation and induces apoptosis involving MAPKs and caspase-8/-9/-3 signals in human acute myeloid leukemia cells // *Tumour Biol.* 2014. V. 35 (12). P. 11903-11911.
12. Vaiyapuri S., Roweth H., Ali M. S., Unsworth A. J., Stainer A. R., Flora G. D., Crescente M., Jones C. I., Moraes L. A., Gibbins J. M., Pharmacological actions of nobiletin in the modulation of platelet function // *Br J Pharmacol.* 2015. V. 172 (16). P. 4133-4145.
13. Ashrafizadeh M., Zarrabi A., Saberifar S., Hashemi F., Hushmandi K., Hashemi F., Moghadam E. R., Mohammadinejad R., Najafi M., Garg M., Nobiletin in Cancer Therapy: How This Plant Derived-Natural Compound Targets Various Oncogene and Onco-Suppressor Pathways // *Biomedicines.* 2020. V. 8 (5).
14. Lu W. J., Lin K. C., Liu C. P., Lin C. Y., Wu H. C., Chou D. S., Geraldine P., Huang S. Y., Hsieh C. Y., Sheu J. R., Prevention of arterial thrombosis by nobiletin: in vitro and in vivo studies // *J Nutr Biochem.* 2016. V. 28. P. 1-8.
15. Braune S., Kupper J. H., Jung F., Effect of Prostanoids on Human Platelet Function: An Overview // *Int J Mol Sci.* 2020. V. 21 (23).
16. Noe L., Peeters K., Izzi B., Van Geet C., Freson K., Regulators of platelet cAMP levels: clinical and therapeutic implications // *Curr Med Chem.* 2010. V. 17 (26). P. 2897-2905.
17. Bianchi G., Ravera S., Traverso C., Amaro A., Piaggio F., Emionite L., Bachetti T., Pfeffer U., Raffaghello L., Curcumin induces a fatal energetic impairment in tumor cells in vitro and in vivo by inhibiting ATP-synthase activity // *Carcinogenesis.* 2018. V. 39 (9). P. 1141-1150.
18. Mapoung S., Pitchakarn P., Yodkeeree S., Ovatlarnporn C., Sakorn N., Limtrakul P., Chemosensitizing effects of synthetic curcumin analogs on human multi-drug resistance leukemic cells // *Chem Biol Interact.* 2016. V. 244. P. 140-148.
19. Keihanian F., Saeidinia A., Bagheri R. K., Johnston T. P., Sahebkar A., Curcumin, hemostasis, thrombosis, and coagulation // *J Cell Physiol.* 2018. V. 233 (6). P. 4497-4511.
20. Ravindran J., Prasad S., Aggarwal B. B., Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? // *AAPS J.* 2009. V. 11 (3). P. 495-510.
21. Moghtaderi H., Sepehri H., Attari F., Combination of arabinogalactan and curcumin induces apoptosis in breast cancer cells in vitro and inhibits tumor growth via overexpression of p53 level in vivo // *Biomed Pharmacother.* 2017. V. 88. P. 582-594.
22. Anand P., Kunnumakkara A. B., Newman R. A., Aggarwal B. B., Bioavailability of curcumin: problems and promises // *Mol Pharm.* 2007. V. 4 (6). P. 807-818.

23. Srivastava K. C., Bordia A., Verma S. K., Curcumin, a major component of food spice turmeric (*Curcuma longa*) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1995. V. 52 (4). P. 223-227.
24. Maheswarajah A., Rao L. J., Naidu K. A., Anti-platelet activity of water dispersible curcuminoids in rat platelets // *Phytother Res*. 2015. V. 29 (3). P. 450-458.
25. Biesalski H. K., Polyphenols and inflammation: basic interactions // *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007. V. 10 (6). P. 724-728.
26. Ramirez-Garza S. L., Laveriano-Santos E. P., Marhuenda-Munoz M., Storniolo C. E., Tresserra-Rimbau A., Vallverdu-Queralt A., Lamuela-Raventos R. M., Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials // *Nutrients*. 2018. V. 10 (12).
27. Koushki M., Amiri-Dashatan N., Ahmadi N., Abbaszadeh H. A., Rezaei-Tavirani M., Resveratrol: A miraculous natural compound for diseases treatment // *Food Sci Nutr*. 2018. V. 6 (8). P. 2473-2490.
28. Wicinski M., Socha M., Walczak M., Wodkiewicz E., Malinowski B., Rewerski S., Gorski K., Pawlak-Osinska K., Beneficial Effects of Resveratrol Administration-Focus on Potential Biochemical Mechanisms in Cardiovascular Conditions // *Nutrients*. 2018. V. 10 (11).
29. Violi F., Pignatelli P., Platelet oxidative stress and thrombosis // *Thromb Res*. 2012. V. 129 (3). P. 378-381.
30. Singh N. K., Rao G. N., Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies // *Prog Lipid Res*. 2019. V. 73. P. 28-45.
31. Borin T. F., Angara K., Rashid M. H., Achyut B. R., Arbab A. S., Arachidonic Acid Metabolite as a Novel Therapeutic Target in Breast Cancer Metastasis // *Int J Mol Sci*. 2017. V. 18 (12).
32. Yeung J., Tourdot B. E., Adili R., Green A. R., Freedman C. J., Fernandez-Perez P., Yu J., Holman T. R., Holinstat M., 12(S)-HETrE, a 12-Lipoxygenase Oxylin of Dihomo-gamma-Linolenic Acid, Inhibits Thrombosis via G α Signaling in Platelets // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016. V. 36 (10). P. 2068-2077.
33. Svensson Holm A. C., Grenegard M., Ollinger K., Lindstrom E. G., Inhibition of 12-lipoxygenase reduces platelet activation and prevents their mitogenic function // *Platelets*. 2014. V. 25 (2). P. 111-117.
34. Singh A. K., Kant S., Parshad R., Banerjee N., Dey S., Evaluation of human LOX-12 as a serum marker for breast cancer // *Biochem Biophys Res Commun*. 2011. V. 414 (2). P. 304-308.

35. Zhong C., Zhuang M., Wang X., Li J., Chen Z., Huang Y., Chen F., 12-Lipoxygenase promotes invasion and metastasis of human gastric cancer cells via epithelial-mesenchymal transition // *Oncol Lett.* 2018. V. 16 (2). P. 1455-1462.
36. Nie D., Krishnamoorthy S., Jin R., Tang K., Chen Y., Qiao Y., Zacharek A., Guo Y., Milanini J., Pages G., Honn K. V., Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells // *J Biol Chem.* 2006. V. 281 (27). P. 18601-18609.
37. Tourdot B. E., Holinstat M., Targeting 12-Lipoxygenase as a Potential Novel Antiplatelet Therapy // *Trends Pharmacol Sci.* 2017. V. 38 (11). P. 1006-1015.
38. Mashima R., Okuyama T., The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives // *Redox Biol.* 2015. V. 6. P. 297-310.
39. Adili R., Tourdot B. E., Mast K., Yeung J., Freedman J. C., Green A., Luci D. K., Jadhav A., Simeonov A., Maloney D. J., Holman T. R., Holinstat M., First Selective 12-LOX Inhibitor, ML355, Impairs Thrombus Formation and Vessel Occlusion In Vivo With Minimal Effects on Hemostasis // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017. V. 37 (10). P. 1828-1839.
40. Yeh C. H., Ma K. H., Liu P. S., Kuo J. K., Chueh S. H., Baicalein Decreases Hydrogen Peroxide-Induced Damage to NG108-15 Cells via Upregulation of Nrf2 // *J Cell Physiol.* 2015. V. 230 (8). P. 1840-1851.
41. Takami M., Preston S. L., Behrman H. R., Eicosatetraenoic and eicosatrienoic acids, lipoxygenase inhibitors, block meiosis via antioxidant action // *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000. V. 278 (4). P. C646-650.