

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет біології, географії та екології
Кафедра біології людини та імунології

**МЕХАНІЗМ РОЗВИТКУ АДАПТАЦІЙНИХ ЗМІН У КЛІТИНАХ В
УМОВАХ СТРЕСУ**

Кваліфікаційна робота (проект)
на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»

Виконала: студентка 2 курсу 211 М групи
Спеціальності 091 Біологія
Освітньої програми Біологія
Андрющенко Олександра Павлівна
Керівник: кандидат біологічних наук,
доцент Шкуропат Анастасія Вікторівна
Рецензент: завідувачка Лабораторії
особливо небезпечних інфекцій
ДУ «Херсонський обласний
лабораторний центр» МОЗ України
Панченко Галина

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AIF - фактор індукції апоптозу

Atg- аутофагія

Apoptosis regulator Bcl-2-регулятор апоптоза, внутрішньоклітинний білковий фактор

Araf-1- (англ. Apoptotic protease activating factor 1, Araf-1) фактор активації апоптотичної протеази 1

ASK1-англ. Apoptosis signal-regulating kinase 1- Кіназа 1, що регулює сигнал апоптозу

AKT1 - (англ. RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, Protein kinase B alpha) - внутрішньоклітинний фермент, один із трьох членів сімейства протеїнкіназ

ATF6 –.Activating Transcription Factor 6- активуючий фактор транскрипції 6

АФК -активні форми кисню

BH 3- апоптичні білки

BIR- бакуловірус

Becn1 — білок клітинної системи аутофагії

BAG-1- (англ. BCL2 associated athanogene 1) – білок, який кодується однойменним геном, розташованим у людей на короткому плечі 9-ї хромосоми

Bax- (англ. Bcl2-associated X protein)-регулятор апоптозу

BH 3- апоптичні білки

bbCID - широкосмугова дисоціація

CREB (cAMP response element-binding protein) - транскрипційний фактор

CD95-(англ. cluster of differentiation 95) - кластер диференціювання 95

cIAP1-(англ. cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1) - клітинний інгібітор апоптозу, білок 1

DAXX- англ. Death-associated protein 6) - білок, що кодується у людини геном

DnaJ/Hsp40- (білок теплового шоку 40) зберігалися протягом еволюції та є важливими для трансляції, згортання, розгортання, транслокації та деградації білка

ДН- діабетична нефропатія

ER- ендоплазматичний ретикулум

ERAD- молекули ER-асоційованої деградації

eIF2 - (англ.Eukaryotic Initiation Factor 2) фактор ініціації еукаріот

ERSE (англ. ER stress response element)- елемент реакції на стрес

EI- електронна іонізація

FADD - (англ. Fas associated via death domain)- Fas, пов'язаний через домен смерті- білок, який кодується однойменним геном

GRP (англ. Gastrin releasing peptide)- пептид, що вивільняє гастрин

GSH- глутатіон

GSSG- глутатіону дисульфід

HSF- фактор теплового шоку

Hsps- набір еволюційно збережених білків

Hsp70-білки теплового шоку масою 70

HRSV- респіраторно-синцитіальний вірус людини

IRE1 α — це фермент, який у людини кодується геном ERN1

ITDR- виявлення загроз ідентифікації та реагування

ITTR-інвертовані кінцеві повороти

IFN- інтерферон

JNK-(англ. c-Jun N-terminal kinases)- кінцеві кінази

LC3-асоційований фагоцитоз

LRTI- інфекцій нижніх дихальних шляхів

MCL1-індукований білок диференційованих клітин мієлоїдного лейкоза

MS-CETSA- аналіз мас-спектрометрії клітинного теплового зсуву

NF-E2- субодиниця фактора транскрипції NF-E2 45 кДа — це білок, який у людини кодується геном NFE2

Nrf2-the nuclear factor erythroid 2- ядерний фактор еритроїд 2

NAIP (англ. NLR family apoptosis inhibitory protein) – білок, який кодується однойменним геном, розташованим у людей на короткому плечі 5-ї хромосоми.

nsOCT- наночутлива оптична когерентна томографія

O-GlcNAcylation- O-зв'язана N-ацетилглюкозамінова трансфераза

ORP150 (англ. oxygen-regulated protein)- білок, регульований киснем

PKR- протеїнкіназа

PERK/PEK -член сімейства кіназ eIF2альфа, що активуються у відповідь на різні клітинні стреси.

RIP1 -взаємодіюча з рецептором серин/треонін-протеїнкіназа 1

ROS (англ.Reactive oxygen species)-активні форми кисню

SP1- протеаза сайту-1

SP-2- протеаза сайту-2

SREBPs (англ. Sterol regulatory element binding transcription factor)- фактор транскрипції, що зв'язує регуляторний елемент стеролу

SOD- супероксиддисмутаза

siRNA-(англ. Small interfering RNA (siRNA), short interfering RNA or silencing RNA)- мала інтерферуюча РНК

SEM- скануюча мікроскопія

TRAIL-(англ. Tumor necrosis factor ligand superfamily member)- Член надродини лігандів фактора некрозу пухлини

TNFR-(англ. Tumor necrosis factor receptors)- рецептори фактора некрозу пухлини

TNFR1-мембранний білок

TNF α - фактор некрозу пухлини альфа

TRAF2 (англ. TNF receptor associated factor 2)- фактор 2, пов'язаний з рецептором TNF

ТСА- цикл трикарбонової кислоти

UPR (англ. unfolded protein response, UPR) -відповідь на незгорнуті білки

UVRAG-(англ. UV radiation resistance-associated gene protein)- генний білок, пов'язаний із стійкістю до УФ-випромінювання

X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) is a member of the Inhibitor of apoptosis family of proteins (IAP)

ХВР1 -(англ.X-box binding protein 1) X-бокс зв'язуючий білок 1

XIAP- X-зв'язаний інгібітор протеїну апоптозу

ХОЗЛ- хронічне обструктивне захворювання легень

ЦД- цукровий діабет

ЗМІСТ

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ.....	2
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1 ТИПИ СТРЕСУ ТА МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ АДАПТАЦІЙНИХ ЗМІН У КЛІТИНАХ.....	11
1.1. Огляд реакцій клітинного стресу.....	11
1.2. Загибель клітин, спричинена стресом.....	12
1.2.1 Апоптоз.....	13
1.2.2. Аутофагічна смерть клітин.....	16
1.2.3. Некроз.....	18
1.3. Реакції клітинного стресу.....	20
1.3.1. Реакція на тепловий шок.....	20
1.3.2. Розгорнута білкова відповідь (UPR).....	23
1.3.3. Реакція на окислювальний стрес.....	26
РОЗДІЛ 2 МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ТА СТРУКТУРНИХ ЗМІН У КЛІТИНАХ.....	31
2.1. Метаболомічне дослідження метаболічних змін у ниркових клітинах у відповідь на вплив високого вмісту глюкози на основі рідинної або газової хроматографії в поєднанні з мас-спектрометрією.....	31
2.2. Метаболічні зміни при інфікуванні епітеліальних клітин респіраторно-синцитіальним вірусом.....	33
2.3. Клітинний метаболічний стрес: розгляд того, як клітини реагують на надлишок поживних речовин.....	35

2.4.Структурно-функціональні зміни клітинних компонентів за допомогою електронної мікроскопії.....	37
2.5.Роль електронної мікроскопії у вивченні континууму змін мембранних структур під час поліовірусної інфекції.....	38
2.6.Наночутлива оптична когерентна томографія для виявлення структурних змін стовбурових клітин.....	41
2.7.Моніторинг структурної модуляції редокс-чутливих білків у клітинах за допомогою MS-CETSA.....	44
РОЗДІЛ 3 ВИВЧЕННЯ МЕХАНІЗМУ АДАПТАЦІЙНИХ ЗМІН У КЛІТИНАХ В УМОВАХ СТРЕСУ.....	47
3.1. Дослідження метаболічних змін у ниркових клітинах у результаті впливу високого вмісту глюкози за допомогою рідинної або газової хроматографії в поєднанні з мас-спектрометрією.....	47
3.2. Спостереження за метаболічними змінами епітеліальних клітин при інфікуванні респіраторно-синцитіальним вірусом.....	48
3.3.Рекція клітин на надлишок поживних речовин.....	50
3.4.Зміни мембранних структур клітин під час поліовірусної інфекції.....	51
3.5.Виявлення структурних змін в стовбурових клітинах за допомогою наночутливої оптичної когерентної томографії.....	53
3.6. Результати методики MS-CETSA у спостереженні структурнох модуляції редокс-чутливих білків у клітинах.....	54
ВИСНОВОК.....	57
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	60

ВСТУП

Актуальність теми. Клітини можуть реагувати на стрес різними способами, починаючи від активації шляхів виживання до ініціації загибелі клітин, що в кінцевому підсумку призводить до знищення пошкоджених клітин.

Виявляють клітини захисну чи руйнівну реакцію на стрес, значною мірою залежить від характеру та тривалості стресу, а також від типу клітин. Крім того, часто існує взаємодія між цими реакціями, яка в кінцевому рахунку визначає долю клітини, що зазнала стресу. Механізм, за допомогою якого клітина гине (тобто апоптоз, некроз, піроптоз або аутофагічна загибель клітин), залежить від різних екзогенних факторів, а також від здатності справлятися зі стресом, якому вона піддається. Наслідки клітинних стресових реакцій на фізіологію людини та різноманітні хвороби які вони спричиняють і будуть обговорюватися в цій роботі в контексті деяких основних проблем охорони здоров'я у світі, таких як діабет, рак та нейродегенеративні захворювання [1].

Реакції клітинного стресу є невід'ємною частиною нормальної фізіології, щоб забезпечити виживання клітини або альтернативно усунути пошкоджені, або небажані клітини. Можна виділити кілька різних реакцій на стрес, серед яких реакції на тепловий шок, розгортання білка, пошкодження ДНК і реакції на окислювальний стрес. Незважаючи на окремі сигнальні компоненти, ці різні реакції на стрес можуть зрештою підживити загальні ефекторні механізми загибелі клітини, якщо клітина не в змозі впоратися зі стресом. Чи запускає клітинний стрес загибель клітини або програми виживання клітини, визначається набором різних факторів, серед яких початковий стресовий стимул, тип клітини та фактори навколишнього середовища. Оскільки аномальні реакції клітинного стресу тісно пов'язані з багатьма поширеними захворюваннями людини, очікується, що краще розуміння основних молекулярних механізмів дозволить втручатися в ці процеси, наприклад,

переключати таку відповідь із загибелі клітини на програми виживання чи навпаки, залежно від бажаного результату [2,3].

Мета дослідження- дослідити механізми розвитку адаптаційних змін у клітинах в умовах стресу.

Завдання дослідження:

1. Дослідження різних типів стресу та відповідно процесу розвитку пристосувань у клітинах які спричинені подразниками.
2. Дослідження метаболічних та структурних змін у клітинах за допомогою сучасних методів.
3. Вивчення механізму адаптаційних змін у клітинах в умовах стресу, та результативності нових методів, які направлені на дослідження даної проблематики.

Методи дослідження. Аналіз та узагальнення наукової літератури з проблеми; пристосувань та змін у клітині в умовах стресу. Розгляд таких методик: метаболомічне дослідження на основі рідинної або газової хроматографії в поєднанні з мас-спектрометрією. Моніторинг структурної модуляції редокс-чутливих білків у клітинах за допомогою MS-CETSA. Наночутлива оптична когерентна томографія для виявлення структурних змін стовбурових клітин. Електронна мікроскопія у вивченні континууму змін мембранних структур під час поліовірусної інфекції.

Об'єкт дослідження- метаболічні та структурні зміни у клітинах в умовах стресу.

Предмет дослідження- вплив стресу на адаптаційні зміни в клітині.

Зв'язок роботи з науковими темами: наукове дослідження виконувалося згідно з ініціативною темою «Дослідження впливу цитокінів в умовах *in vitro*» (державний реєстраційний номер 0120U101313), керівник доц. Шкуропат А.В.

Наукова новизна дослідження полягає у тому, що:

- будуть представлені сучасні методи дослідження структурних та метаболічних змін в клітинах в умовах дії на них стресових факторів.
- дослідження нададуть можливість підтвердити необхідність користування такими методами в майбутньому.
- доповняться знання щодо того, що насправді відбувається в клітинах в результаті впливу на них різних подразників.

Практичне значення отриманих результатів. Розгляд та вивчення нових методик для спостереження за структурними змінами в клітині дозволить ще більше дізнатися про механізми адаптації до стресових чинників які не можливо було помітити раніше. Крім того, нове уявлення про механістичну основу реакцій на стрес відкриє нові перспективи для розробки молекулярно-цільових підходів до лікування і, таким чином, матиме великий потенціал для відкриття ліків.

Апробація: матеріали роботи були представлені: в електронній версії альманаху «Магістерські студії» з темою «Механізм розвитку адаптаційних змін у клітинах в умовах стресу» Вип. 23. 2023. – Херсон. ХДУ, 2023 – 453 с.

РОЗДІЛ 1

ТИПИ СТРЕСУ ТА МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ АДАПТАЦІЙНИХ ЗМІН У КЛІТИНАХ

1.1. Огляд реакцій клітинного стресу

Початкова реакція клітини на стресовий подразник спрямована на те, щоб допомогти клітині захиститися від стресового фактора та відновитися від нього. Однак, якщо шкідливий подразник не усувається, вони активують сигнальні шляхи смерті. Той факт, що виживання клітини критично залежить від здатності відповідати на подразники навколишнього середовища або внутрішньоклітинного стресу, може пояснити, чому ця реакція є висококонсервативною в еволюції. Наприклад, антиоксидантні захисні механізми проти білків окисного пошкодження та стресу, таких як білки теплового шоку, виникають у нижчих організмів, а також у ссавців.

Існує багато різних типів стресу, і реакція клітини на ці умови буде залежати від його варіації та рівня. Наприклад, захисні відповіді на подразнення, такі як реакція теплового шоку або реакція розгорнутого білка, опосередковують збільшення активності білка-шаперону, що підвищує здатність клітини до згортання білка, таким чином протидіючи стресу та сприяючи її виживанню. Адаптивні можливості клітини в кінцевому рахунку визначають, що з нею буде далі.

Тому залежно від рівня та режиму стресу встановлюються різні захисні механізми та стратегії виживання; однак, якщо вони не вдаються, тоді активуються програми клітинної смерті, щоб усунути ці пошкоджені клітини з організму. Механізм, за допомогою якого клітина гине, тобто апоптоз,

некроз, піроптоз або аутофагічна смерть клітини, часто залежить від її здатності справлятися з умовами, яким вона піддається. У даному розділі буде розглянуто різні форми загибелі клітин, які можуть бути активовані адаптивними реакціями, оскільки активація сигнальних шляхів смерті є остаточною відповіддю на всі типи постійного нерозв'язного стресу. Також будуть проаналізовані типи стресу, з якими може зіткнутися клітина, і різні реакції, які активуються, щоб вижити в несприятливих умовах.

1.2. Загибель клітин, спричинена стресом

Смерть клітини має багато видів і форм. Дослідження клітинної смерті охоплює не лише вивчення запрограмованих форм знищення клітини (як апоптозу, так і аутофагічної клітинної смерті), некрозу та інших способів руйнування клітини, але й роль, яку ці явища відіграють у фізіологічних і патологічних процесах, включаючи розвиток, старіння та захворювання.

Тема клітинної смерті привернуло велику увагу науковців в останні два десятиліття, головним чином із-за його значення для розвитку, дегенеративних захворювань і раку. Проте галузь дослідження загибелі клітини аж ніяк не є новою [4]. Поняття руйнування клітин і пов'язана з ними термінологія розвивалися ще з 19 століття. Термін « запрограмована клітинна смерть» відноситься до контрольованих або регульованих форм смерті , пов'язаних із рядом біохімічних і морфологічних змін [5,6]. Усвідомлення того , що деякі форми загибелі клітини були біологічно контрольовані або запрограмовані , призвело до використання цих процесів і справило глибокий вплив на різні галузі біології та медицини [7,8] .

У наш час запрограмована клітинна смерть є синонімом апоптозу; однак, виходячи з оригінального визначення, воно також відноситься до аутофагічної смерті клітин [9]. Термін апоптоз вперше був використаний

для опису особливої морфології знищення клітини [10], спільної для переважної більшості фізіологічних клітинних смертей. Ця морфологія включає зморщування та утворення бульбашок клітин, округлення та фрагментацію ядер із конденсацією та накопиченням хроматину, зморщування та фагоцитоз клітинних фрагментів без супутніх запальних реакцій (у більшості випадків) [11] . Морфологія клітин, що піддаються апоптозу, здається несхожою та відмінною від морфології, пов'язаної з некрозом . Некроз , термін, який зазвичай використовують патологи, відноситься до будь-яких смертельних випадків, пов'язаних із втратою контролю над іонним балансом, поглинанням води, набряком і лізисом клітин [12 , 13] . Цей лізис вивільняє багато внутрішньоклітинних компонентів, залучаючи імунні клітини та провокуючи запальну відповідь.

1.2.1. Апоптоз

У 1980-х роках апоптоз став центром уваги, насамперед через відносну легкість, з якою його можна було морфологічно відрізнити від інших типів клітинної смерті. Протягом кількох років апоптоз і розмежування основних біохімічних і молекулярних шляхів домінували в дослідженнях даної біологічної події. Відкриття сімейства білків Bcl-2, рецепторів смерті , каспаз [14] , вивільнення мітохондріального цитохрому *c* і ролі ендоплазматичного ретикулуму в апоптозі були лише кількома основними віхами в історії цієї галузі. Сьогодні морфологічні та біохімічні зміни, пов'язані з апоптозом, в основному пояснюються активацією каспаз, і апоптоз став загально визнаним як каспаз-залежна програмована загибель клітин [15] .

З усіх форм клітинної смерті найкраще охарактеризований апоптоз, і його чітко регульована природа робить його привабливою мішенню для терапевтичного втручання. Він є висококонсервативним протягом еволюції і

відіграє важливу фізіологічну роль як у ембріональному розвитку, так і в старінні . Було показано, що різні типи стимулів клітинного стресу викликають апоптоз, включаючи хіміотерапевтичні засоби, опромінення, окислювальний стрес і ER-стрес. Протеолітичні ферменти, сімейство цистеїнових протеаз, діють як звичайні молекули ефекторів смерті в різних формах апоптозу . Вони синтезуються як неактивні проферменти, які при активації розщеплюють різні субстрати в цитоплазмі або ядрі. Це призводить до багатьох морфологічних особливостей апоптотичної загибелі клітин , наприклад, фрагментації полінуклеосомної ДНК, втрати загальної форми клітини та ядерного скорочення .

Під час апоптозу каспази активуються різними механізмами. Стимуляція рецепторів смерті суперсімейства рецепторів фактора некрозу пухлин (TNF), таких як CD95 (APO-1/Fas) або TNF-пов'язаних рецепторів ліганду, що індукуює апоптоз (TRAIL), їхніми відповідними лігандами або агоністичними антитілами призводить до агрегації рецепторів і рекрутування адаптерної молекули Fas-асоційованого домену смерті (FADD) і прокаспази-8 для формування сигнального комплексу, що індукуює смерть (DISC). Після рекрутингу каспаза-8 активується та ініціює апоптоз шляхом прямого розщеплення наступних ефекторних протеолітичних ферментів[16]. Мітохондріальний шлях до активації каспази ініціюється вивільненням із мітохондріального міжмембранного простору апоптогенних факторів, таких як цитохром *c*, фактор індукції апоптозу (AIF), другий мітохондрійний активатор каспази (Smac)/прямий IAP-зв'язуючий білок з низьким рІ (DIABLO) або Omi/протеїн високотемпературної потреби A2 (HtrA2). Вивільнення цитохрому *c* у цитозоль призводить до активації каспази-3 через утворення апоптосомного комплексу, що містить цитохром *c* /Araf-1/caspase-9 . Smac/DIABLO або Omi/HtrA2 сприяє активації каспази шляхом нейтралізації гальмівних ефектів інгібіторів білків апоптозу (IAP) [17]. Активацію каспаз необхідно суворо контролювати через потенційний

шкідливий вплив на виживання клітин, якщо вони активовані неналежним чином. Наприклад, стійкість до апоптозу може бути викликана аномальною функцією або експресією IAP. Вони представляють групу ендогенних інгібіторів каспаз з восьми членів у клітинах людини, тобто XIAP, cIAP1, cIAP2, сурвівін, лівін (ML-IAP), NAIP, Bruce (apollon) та ILP-2 . Усі білки IAP містять один або більше доменів повторення IAP бакуловірусу (BIR), які опосередковують їх інгібіторну взаємодію з каспазами . Серед білків сімейства IAP XIAP є найпотужнішим інгібітором каспаз і блокує апоптоз шляхом зв'язування з активними каспазами-3 і -7 і перешкоджаючи активації каспаз-9 .

Крім того, співвідношення антиапоптотичних і проапоптотичних білків родини Bcl-2 регулює чутливість до апоптозу. Білки Bcl-2 містять як антиапоптотичні члени сімейства, наприклад, Bcl-2, Bcl-X L і Mcl-1, так і проапоптотичні молекули, такі як Bax, Bak і молекули лише домену BH 3 . Відповідно до моделі прямої активації активації білка Bcl-2, білки BH 3, які функціонують як прямі активатори (такі як Bim і розщеплена форма Bid, безпосередньо зв'язуються з Bax і Bak, щоб стимулювати їх активацію . У цій моделі білки BH 3, які діють як сенсibilізатори, такі як Bad, сприяють апоптозу шляхом зв'язування з протеїнами Bcl-2, які просуваються [18]. Навпаки, модель непрямой активації передбачає, що білки, які містять лише BH 3, активують Bax і Bak непрямим чином шляхом зв'язування з кількома антиапоптотичними білками Bcl-2, які інгібують Bax і Bak, що, у свою чергу, призводить до вивільнення Bax і Bak [19]. Крім того, чутливість до апоптозу може контролюватися IAP через регуляцію додаткових сигнальних каскадів, наприклад, NF- κ B, JNK, TNFR та убіквітин/протеасомний шлях . Антиапоптотичні механізми, що регулюють загибель клітин, також були залучені до надання лікарської стійкості пухлинним клітинам.

1.2.2. Аутофагічна смерть клітин

Аутофагія (самопоїдання) є багатоетапним процесом, який характеризується везикулярною секвестрацією та деградацією довгоіснуючих цитоплазматичних білків і органел, наприклад, мітохондрій . Везикула з подвійною мембраною, що утворюється, називається аутофагосою . Відкриття генів, пов'язаних з аутофагією (atg), спочатку в дріжджах, а згодом у людей, значно покращило молекулярне розуміння механізмів, які беруть участь у її контролі. Білковий продукт гена-супресора пухлин *Bec1* є гомологом *Atg6* у ссавців і утворює мультибілковий комплекс разом із *Vps34*, фосфатидилінозитол-3-кіназою класу III, *UVRAG* (ген супресора пухлин, пов'язаний із стійкістю до ультрафіолетового опромінення) та міристильованою кіназою (*Vps15* або *p150* у людей) [20]. Цей комплекс необхідний для ініціації утворення аутофагосоми. Після формування цього комплексу *Vps34* активується і каталізує утворення фосфатидилінозитол-3-фосфату, необхідного для зародження везикул.

Існують дві основні системи кон'югації білка, які необхідні для утворення аутофагосоми, тобто кон'югація *Atg12–Atg5* та системи кон'югації *Atg8-фосфатидилетаноламін* . Механічно обидві системи кон'югації функціонують у спосіб, який тісно пов'язаний з кон'югацією убіквітину з білками, з відповідними ферментами, що сприяють кон'югації, які нагадують ферменти *E1* і *E2* у кон'югації убіквітину [21] . На шляху кон'югації *Atg12–Atg5* *Atg12* ковалентно кон'югується з *Atg5* за допомогою *E1*-подібного ферменту *Atg7* та *E2*-подібного ферменту *Atg10*. В іншому шляху кон'югації фосфатидилетаноламін (PE) кон'югується з LC3, одним із гомологів *Atg8* у ссавців. Цей процес включає послідовну дію протеази *Atg4*, *E1*-подібного ферменту *Atg7* і *E2*-подібного ферменту *Atg3*. Згодом кон'югація ліпідів призводить до перетворення розчинної форми LC3, тобто LC3-I, у форму, асоційовану з аутофагічними везикулами, яка називається LC3-II . Таким

чином, LC3 є розчинним у ненапружених умовах і піддається асоціації з периферичними мембранами аутофагосом під час індукції аутофагії. Через злиття з лізосомами вміст аутофагосом руйнується під дією кислотозалежних ферментів.

Аутофагія, як правило, спостерігається в клітинах, які піддаються різноманітним метаболічним і терапевтичним стресам, включаючи депривацію фактора росту, інгібування рецептора тирозинкінази/Akt/передачі сигналів рапаміцину (mTOR) у ссавців, нестачу поживних речовин, ішемію/реперфузію, інгібування протеасомної деградації, накопичення внутрішньоклітинного кальцію та стресу ендоплазматичного ретикулуму (ER) [22]. Активні форми кисню (АФК) можуть забезпечувати спільний зв'язок між сигналами клітинного стресу та ініціацією аутофагії, оскільки, як повідомлялося, накопичення АФК призводить до інактивації цистеїнової протеази ATG4, що, у свою чергу, спричиняє накопичення попередника ATG8-фосфоетаноламіну, який є необхідним для ініціації утворення аутофагосом .

Функціональний зв'язок між аутофагією та загибеллю клітин є складним у тому сенсі, що в більшості клітинних умов аутофагія функціонує як адаптація до стресу, яка запобігає загибелі клітини, тоді як за деяких обставин вона є альтернативним шляхом до загибелі клітини. Цей складний взаємозв'язок між аутофагією та загибеллю клітин означає, що ці реакції певною мірою пов'язані на молекулярному рівні. Однак ключові молекулярні події, які в кінцевому підсумку визначають, чи є аутофагія захисною чи деструктивною, все ще погано вивчені.

Хоча досі залишається суперечливим, чи є вона захисною чи токсичною для клітин, накопичення доказів свідчить про те, що вона відіграє корисну роль у

серці як за фізіологічних, так і за патологічних умов . Було показано, що даний процес опосередковує обмін внутрішньоклітинних білків і органел у серці та захищає від гемодинамічного стресу [23]. Відповідно до цього, рапаміцин, який індукує аутофагію шляхом інгібування mTOR, може захистити міокард від ішемічного -реперфузійного пошкодження.

Нещодавні дослідження також продемонстрували, що зниження регуляції факторів транскрипції, активація фактора транскрипції 5 або 7 (ATF5 або ATF7), за допомогою siRNA запобігає загибелі клітин, спричиненій стресом, що свідчить про те, що рівень або час аутофагії може бути критичним для вирішення долі клітин. Дана смерть клітин в основному була показана під час розвитку. Проте протягом останніх років накопичення доказів свідчить про те, що інгібування апоптозу індукує загибель клітин, яка або пов'язана з аутофагією, або залежить від неї [24].

Існують докази перехресного зв'язку між апоптозом і аутофагією на молекулярному рівні, особливо щодо родини Bcl-2. На додаток до його ролі в інгібуванні апоптозу, було також показано, що Bcl-2 пригнічує аутофагію і аутофагічну загибель клітин . Цей ефект опосередковується здатністю Bcl-2 взаємодіяти з Beclin 1, ключовим білком у формуванні аутофагосоми . Насправді було показано, що Beclin 1 є новим білком, що містить лише BH 3, і взаємодіє з низкою антиапоптозних членів сімейства Bcl-2 [25].

1.2.3. Некроз

Протягом багатьох років некроз розглядався як випадковий спосіб загибелі клітин який означає, що в багатоклітинному організмі це нерегульований процес. Проте зараз накопичується все більше доказів того, що виконання некротичної загибелі клітин також регулюється набором сигнальних шляхів . Рецептори домену смерті, наприклад TNFR1, і Toll-подібні рецептори викликають некроз, зокрема в присутності інгібіторів каспази [26]. Крім

того, повідомлялося про загибель некротичних клітин у відповідь на стимули клітинного стресу, включаючи ішемію, ексайтотоксичність глутамату в нейронах або ракових клітинах, які зазнали впливу агентів, що пошкоджують алкілюючи ДНК. Морфологічно некроз характеризується збільшенням об'єму клітини, набуханням органел і розривом плазматичної мембрани, що призводить до втрати внутрішньоклітинного вмісту. Було описано декілька каскадів сигнальної трансдукції, які беруть участь у поширенні некротичної клітинної смерті. Існує все більше доказів того, що серин/треонін-кіназа RIP1 є одним із ключових медіаторів смерті некротичних клітин, принаймні у випадку рецепторів смерті або Toll-подібних рецепторів [27]. Дослідження на RIP1-дефіцитних клітинах лейкемії показали, що RIP1 необхідний для некрозу, викликаного рецептором смерті. Крім того, описано, що він необхідний для індукованої ліпополісахаридом загибелі клітин макрофагів. Згідно з центральною роллю RIP1 у загибелі некротичних клітин, маломолекулярні інгібітори кінази RIP1, як повідомляється, захищають від ішемічного ураження мозку в моделі некрозу *in vivo*. На додаток до RIP1, нещодавніми дослідженнями було виявлено, що RIP3 також є критичним для загибелі некротичних клітин. З цією метою RIP3 було ідентифіковано в скрині РНК-інтерференції як необхідний для некрозу у відповідь на стимуляцію TNF α та під час вірусної інфекції. RIP3 взаємодіє з RIP1 і регулює фосфорилування RIP1 і генерацію ROS [28].

Крім того, АФК і кальцій є важливими медіаторами, які беруть участь у поширенні некротичного сигналу при різних його формах, наприклад, при стимуляції TNF α або під впливом дволанцюгової ДНК. АФК можуть утворюватися внутрішньоклітинно за допомогою мітохондрій і гліколізу. Хоча ER є основним внутрішньоклітинним запасом кальцію, описано, що мітохондріальний кальцій стимулює окисне фосфорилування, таким чином сприяючи генерації АФК. Як активні форми кисню, так і кальцій можуть

викликати пошкодження органел і макромолекул, що сприяє втраті цілісності клітини. Крім того, опосередкована кальцієм активація кальпаїну може призвести до розщеплення та інактивації каспаз, тоді як АФК можуть націлюватися на їх активний центр каспаз і деактивувати [29]. Багато стимулів, які викликають некроз, можуть пригнічувати механізм апоптозу.

1.3. Реакції клітинного стресу

Під час тканинного гомеостазу існує рівновага між чистою швидкістю росту та чистою швидкістю загибелі клітин [30]. Під впливом клітинного стресу цей фізіологічний гомеостаз знаходиться в небезпеці. Залежно від типу несприятливого впливу та його тяжкості реакція клітини може бути різною. По суті, якщо стресовий стимул не перевищує певного порогу, клітина може впоратися з ним, встановлюючи відповідну захисну властиву їй відповідь, яка забезпечує виживання клітини. І навпаки, нездатність активувати або підтримувати захисну реакцію, наприклад, якщо стресовий агент є надто сильним, призводить до активації каскадів сигналів стресу, які зрештою підживлюють шляхи загибелі клітин [31] .

1.3.1. Реакція на тепловий шок

Одна з основних дій клітин, спрямованих на виживання, реакція на тепловий шок, спочатку була описана як біохімічна реакція клітин на легкий тепловий стрес (тобто підвищення температури на 3–5 °С вище норми) . З тих пір було визнано, що багато подразників можуть активувати цю відповідь, включаючи окислювальний стрес і важкі метали. Одним із основних клітинних наслідків цих стресів є пошкодження білків, що призводить до агрегації розгорнутих білків. Щоб протидіяти цьому, клітини посилюють експресію білків-шаперонів, які допомагають у повторному згортанні неправильно згорнутих білків і полегшують їх агрегацію. Це надає тимчасовий захист, що

призводить до стану , відомого як термотолерантність, за якого клітини стають більш стійкими до різних токсичних впливів, включаючи летальні підвищення температури, окислювальний стрес [32] .

Під час ініціації відповіді на тепловий шок загальна транскрипція та трансляція білка припиняється, ймовірно, щоб зменшити навантаження неправильно згорнутих білків у клітині. Однак фактори транскрипції, які посилюють експресію певної підмножини захисних генів, вибірково активуються за цих умов; це фактори теплового шоку (HSF) . Клітини хребетних мають три різні HSF: HSF1 необхідний для відповіді на тепловий шок і також необхідний для процесів розвитку, HSF2 і HSF4 важливі для диференціації та розвитку, тоді як HSF3 зустрічається лише в клітинах птахів і, ймовірно, є надлишковим з HSF1. Клітини, отримані від мишей, у яких відсутній HSF1, чутливі до стресу і не здатні розвивати терmostійкість або індукувати гени, що реагують на тепло, на тепловий шок [33] , це підтверджує, що HSF1 відповідає за реакцію на тепловий шок. У більш пізніх роботах простежується, що HSF2 може модулювати HSF1-опосередковану експресію реагуючих на тепло генів [34] .Науковці припускають, що HSF2 також бере участь у транскрипційній регуляції відповіді на тепловий шок.

Неактивний HSF1 підтримується в мономерній формі в цитоплазмі через взаємодію з Hsp90 і кохаперонами . Коли клітина піддається впливу стресових умов, відбувається накопичення розгорнутих білків, які конкурують з HSF1 за зв'язування Hsp90. Таким чином, HSF1 вивільняється з комплексу, стимулюючи його перехід від мономеру до гомотримера, який може транслокуватися до ядра та зв'язуватися з ДНК . HSF зв'язуються з попередніми послідовностями (елементами теплового шоку) у промоторах цільових генів, що призводить до експресії білків теплового шоку (Hsps).

Hsps — це набір еволюційно збережених білків, які згруповані в підродини з молекулярною масою приблизно 110, 90, 70, 60, 40 і 15–30 кДа . Деякі з них, наприклад, Hsp90, конститутивно експресуються і діють внутрішньоклітинно як молекулярні шаперони, запобігаючи передчасному згортанню новонароджених поліпептидів . Інші, зокрема Hsp27 і Hsp70, зазвичай експресуються на низьких базальних рівнях і посилюються у відповідь на екологічні та фізіологічні стресори, і тому вони називаються індукованими Hsp і є частиною відповіді на тепловий шок . Hsp27 належить до підродини стресових білків, малих Hsps, які виявляються практично в усіх організмах. Hsp27 також регулюється шляхом фосфорилування та динамічної асоціації/дисоціації на мультимери, починаючи від димерів і закінчуючи великими олігомерами [35]. Hsp70 є індукцибельним членом сімейства Hsps вагою 70 кДа. Показано, що і Hsp27, і Hsp70 захищають клітини від індукції загибелі клітин різними стресами та різними способами загибелі клітин, включаючи апоптоз і некроз. Вони досягають цих ефектів безпосередньо, через інгібування шляхів загибелі клітин, і опосередковано, через загальну активність, спрямовану на виживання. Наприклад, у якості молекулярних шаперонів індукцибельні Hsps зв'язуються з розгорнутими білками та сприяють їх повторному згортанню, тим самим запобігаючи агрегації білків . Hsp27 може взаємодіяти з актином і, отже, важливий для підтримки цілісності цитоскелету, який може відігравати певну роль у сприянні виживанню [36].

Крім цих непрямих механізмів, Hsp27 і Hsp70 можуть безпосередньо пригнічувати апоптоз шляхом модуляції як внутрішнього, так і зовнішнього шляхів апоптозу та втручання в активацію каспази на кількох різних рівнях . Повідомлялося, що і Hsp27 , і Hsp70 безпосередньо блокують вивільнення проапоптичних факторів, включаючи цитохром *c*, з мітохондрій . У цитозолі ці Hsp можуть блокувати утворення апоптосом і активацію каспаз, що

знаходяться нижче , через їхню здатність зв'язуватися з цитохромом c і прокаспазою-3 (у випадку Hsp27) і прокаспазами -3, -7 і Аraf-1. (у випадку Hsp70). Hsp70 також може взаємодіяти з фактором, що індукує апоптоз (AIF), і пригнічувати його, таким чином інгібуючи апоптотичні ядерні зміни. Hsps також може модулювати шлях рецептора смерті. Повідомляється, що Hsp27 пригнічує DAXX, білок-адаптер, який зв'язує рецептор смерті Fas і датчик стресу ER IRE1 з ASK-1 і проапоптотичною передачею JNK . Hsp70 також пригнічує активність JNK , хоча це спостерігається не у всіх системах . Hsp27 і 70 також можуть взаємодіяти з іншими білками, які регулюють виживання клітин. Наприклад, Hsp27 може взаємодіяти з Ser/Thr кіназою Akt , яка є важливою для тривалої активності Akt . Hsp70 може існувати в комплексі з кохаперонами, включаючи DnaJ/Hsp40 і BAG-1, які впливають на його здатність модулювати апоптоз [37]. Загалом, Hsps можуть бути активовані або індуковані низкою стресів, і вони діють для захисту, впливаючи на різноманітні процеси, які визначають клітинну долю. Hsps є, загалом, молекулами, що забезпечують виживання та антиапоптоз.

1.3.2. Розгорнута білкова відповідь (UPR)

Секреторні та мембранні білки піддаються посттрансляційному процесингу, включаючи глікозилювання, утворення дисульфідних зв'язків, правильне згортання та олігомеризацію в ER. Для того, щоб ефективно виробляти та секретувати зрілі білки, клітинні механізми моніторингу середовища ендоплазматичного ретикулуму є важливими. Вплив клітин на такі стани, як голодування глюкози, пригнічення глікозилювання білків, порушення гомеостазу Ca²⁺ і дефіцит кисню, спричиняє накопичення розгорнутих білків у ER (ER-стрес) і призводить до активації добре організованого набору шляхів під час явище, відоме як відповідь розгорнутого білка (UPR) . UPR, як правило, передається через активацію резидентних білків ER, особливо інозитол-вимагаючого білка-1 (IRE1), протеїнкінази РНК (PKR), схожої на

ER-кінази (PERK), і активуючого фактора транскрипції 6 (ATF6). У деяких клітинах та тканинах додаткові фактори транскрипції типу bZip типу ATF6, такі як OASIS, CREB - H, Tisp40 і Luman, також передають сигнал UPR. Цільові гени UPR включають молекулярні шаперони в ER, каталізатори згортання, субодиниці механізму транслокації (комплекс Sec61), молекули ER-асоційованої деградації (ERAD) і антиоксидантні гени [38].

Серед передавачів UPR, ідентифікованих на даний момент, IRE1 і PERK є трансмембранними протеїнкіназами типу I, які димеризуються для сприяння аутофосфорилуванню та активації у відповідь на стрес ER. Активований IRE1 ендонуклеолітично розщеплює мРНК, яка кодує фактор транскрипції, названий гомологічним ATF/CREB1 (Nac1) у дріжджів та білок-1, що зв'язує X-box (XBP1) у вищих видів. Сплайсовані форми Nac1 або XBP1, у свою чергу, активують транскрипцію цільових генів UPR. Навпаки, активований PERK фосфорилує α -субодиницю еукаріотичного фактора ініціації трансляції-2 (eIF2 α), що призводить до зниження рівня eIF2 і пригнічення трансляції. Сигнальний шлях PERK-eIF2 α також активує транскрипцію генів-мішеней UPR через CAP-незалежну регуляцію трансляції фактора транскрипції ATF4. PERK також може безпосередньо фосфорилувати та активувати фактор транскрипції, NF-E2-пов'язаний фактор-2 (Nrf2), який сприяє клітинному окисно-відновному гомеостазу шляхом індукції експресії антиоксидантних генів [39]. ATF6 є трансмембранним білком типу II, який розщеплюється резидентними протеазами апарату Гольджі, протеазою сайту-1 (SP1) і протеазою сайту-2 (SP-2) у відповідь на стрес ER. Відщеплений N-кінцевий фрагмент ATF6 діє як фактор транскрипції для збільшення транскрипції цільових генів UPR разом з XBP1 і ATF4.

Передача сигналів UPR загалом сприяє виживанню клітин шляхом покращення балансу між білковим навантаженням і здатністю до згортання в ER або шляхом покращення секреції трофічних факторів росту. Однак, якщо

білкове навантаження в ендоплазматичному ретикулумі перевищує його здатність до згортання або існують деякі дефекти в UPR, клітини, як правило, гинуть з ознаками апоптозу (загибель клітин, спричинена стресом ER). Незважаючи на те, що точні молекулярні механізми, які регулюють цей тип клітинної смерті, ще не з'ясовані, було ідентифіковано принаймні три шляхи: шлях каспази-12/каспази-4 та шляхи CHOP та IRE1-JNK. Каспаза-12 [40] у мишей і каспаза-4 у людини були запропоновані як каспази, які ініціюють загибель клітин, викликану стресом ER. Повідомляється, що миші з нульовою дією каспази-12 відносно стійкі до ER-стресу та бета-амілоїдної токсичності . Повідомляється, що каспаза-12 безпосередньо розщеплює прокаспазу-9 без участі цитохрому c /Araf-1. C/EBP гомологічний білок (CHOP), транскрипційний фактор, який індукується нижче шляхів PERK і ATF6, індукує клітинну смерть, викликану стресом ER, принаймні частково шляхом пригнічення експресії Bcl-2 і індукування експресії Bim . IRE1 також бере участь у загибелі клітин, спричиненій стресом ER, шляхом активації JNK через зв'язування з ASK1 і Traf2 [40].

Важлива роль ER-стресу та ER-стрес-індукованої смерті клітин також була продемонстрована в широкому спектрі патофізіологічних ситуацій, включаючи ішемію, діабет, атеросклероз, ендокринні дефекти, розвиток, нейродегенеративні розлади та рак, як описано нижче [41,42].

Серед цілей UPR білки, регульовані глюкозою (GRP), є найбільш вивченими та найкраще охарактеризованими. GRP спочатку ідентифікували як білки, індуковані глюкозним голодуванням . Пізніше було виявлено, що ці молекули були індуковані транскрипцією ER-стресом через цис -діючий елемент, названий ER stress response element (ERSE) . GRP включають молекулярні шаперони в ER, такі як GRP78/Bip, GRP94, ORP150/GRP170, і

оксидоредуктази в ER, такі як PDI, ERp72 і GRP58/ERp57. Накопичені дані свідчать про те, що GRP сприяють виживанню клітин під впливом таких стресів, як гіпоксія або ішемія, ексайтотоксичність глутамату та нейродегенерація. GRP78 може бути потенційним фактором інгібування атеросклерозу шляхом запобігання спричиненій ER стресом загибелі клітин ендотеліальних клітин. Це передбачає інгібування активації SREBPs, молекули, яка індукує біосинтез холестерину та тригліцеридів, або шляхом інгібування прокоагулянтної активності тканинного фактора. Було виявлено, що ORP150/GRP170 пов'язаний із чутливістю до інсуліну як у людей, так і у мишей, як описано нижче. Крім того, GRP також відіграють важливу роль у виживанні під час раннього розвитку ссавців [43].

Цікаво, що нещодавні дослідження показали, що невеликі сполуки, які імітують функції GRP (хімічні шаперони) і ті, які індують ендогенні GRP (молекулярні шаперони-індуктори), можуть запобігати агрегації білка, покращувати секрецію білка і захищати клітини від впливу мозку ішемія або нейродегенерація [44]. Ці результати свідчать про те, що регуляція ER-стресу може бути новою терапевтичною мішенню при різноманітних захворюваннях.

1.3.3. Реакція на окислювальний стрес

Для виживання клітин потрібні відповідні пропорції молекулярного кисню та різноманітних антиоксидантів. Реактивні продукти кисню є одними з найпотужніших загроз, з якими стикаються клітини. До них належать АФК, такі як супероксид-аніон ($O_2^{\cdot-}$), пероксид водню (H_2O_2), синглетний кисень, гідроксильний радикал (OH^{\cdot}), пероксирадикал, а також другий месенджер оксид азоту (NO^{\cdot}), який може реагувати з $O_2^{\cdot-}$ із утворенням пероксинітриту ($ONOO^-$). Зазвичай у клітинах існує рівновага між

прооксидантними видами та антиоксидантними захисними механізмами, такими як ферменти, що метаболізують АФК, включаючи каталазу, глутатіонпероксидазу та супероксиддисмутазу (SOD) та інші антиоксидантні білки, такі як глутатіон (GSH) .

Окислювальний стрес виникає, коли є порушення цього балансу прооксидантів: антиоксидантів, і він бере участь у кількох біологічних і патологічних процесах [45]. Хоча більшість окислювальних порушень можна подолати природним захистом клітини, тривале порушення цього балансу може призвести до апоптотичної або некротичної загибелі клітини .

Активні форми кисню можуть виходити з внутрішньоклітинних або позаклітинних джерел. Автоокислення відновлених респіраторних компонентів мітохондріального транспортного ланцюга електронів викликає утворення проміжних сполук вільного радикала, $O_2^{\cdot-}$ і H_2O_2 , які в присутності заліза можуть утворювати високореактивний радикал $OH\cdot$ за допомогою реакції Фентона. З цими ROS борються SODs, ферменти, які вважаються першою лінією захисту від кисневої токсичності. АФК також можуть вироблятися в цитозолі. Наприклад, каскад арахідонової кислоти, який утворює простагландини та лейкотрієни, може генерувати АФК, коли вивільнений ліпід метаболізується, а деякі ізоферменти цитохрому P-450 є добре відомими продуцентами АФК [46]. Крім того, реакції автоокислення аскорбінової кислоти, низькомолекулярних тіолів, адреналіну та флавінових коферментів можуть викликати утворення АФК. У багатьох із цих випадків цитозольний GSH нейтралізує. Окрім фізіологічних джерел АФК, різноманітні екзогенні агенти можуть сприяти внутрішньоклітинному виробництву вільних радикалів. Більшість цих сполук викликають утворення $O_2^{\cdot-}$ і H_2O_2 . Механізм дії багатьох екзогенних агентів включає окисно-відновний цикл, за допомогою якого електрон приймається для утворення вільного радикала, а потім переноситься на кисень.

Цікаво, що існують докази перехресного зв'язку між окисним стресом та іншими шляхами реакції на стрес. Наприклад, відомо, що окислювальний стрес викликає збільшення експресії певних індукцибельних Hsp, зокрема Hsp27. Повідомлялося, що Hsps захищає від багатьох стресів, крім теплового шоку, включаючи важкі метали, радіацію, оксид азоту та інші окислювачі. Крім того, активація UPR стимулює регуляцію антиоксидантних генів через PERK-залежне фосфорилування фактора транскрипції Nrf2, цільові гени якого включають ферменти, що беруть участь у біосинтезі GSH, і гемоксигеназу-1. Крім того, збурення клітинного редокс-статусу сенсibiliзують клітини до шкідливих наслідків стресу ER. Подібним чином, накопичення доказів свідчить про роль $O_2^{\cdot-}$ в активації аутофагії [47].

АФК можуть пошкоджувати всі основні класи біологічних макромолекул, включаючи нуклеїнові кислоти, білки, вуглеводи та ліпіди. Коли антиоксидантний захист клітини перевантажений, АФК можуть викликати загибель клітини. Численні недавні дослідження показали, що спосіб загибелі клітин залежить від тяжкості ураження. Фактично, окислювачі та антиоксиданти не тільки визначають долю клітини, але також можуть модулювати режим клітинної смерті.

Багато цитотоксичних агентів індукують АФК, у тому числі пероксид і $O_2^{\cdot-}$, які беруть участь в індукції апоптотичної загибелі клітин. H_2O_2 може спричинити вивільнення цитохрому *c* з мітохондрій у цитозоль, а H_2O_2 також може активувати ядерні фактори транскрипції, такі як NF- κ B, AP-1 та p53, які можуть посилювати регуляцію білків смерті або виробляють інгібітори білків виживання. Однією з моделей, запропонованих для H_2O_2 індукції апоптозу, є підвищення регуляції системи Fas-FasL, що призводить до активації каспази-8 і каспаз, розташованих нижче. Також можливо, що

NO^{\bullet} також може інактивувати кілька антиоксидантних ферментів, включаючи каталазу, глутатіонпероксидазу та супероксиддисмутазу. Крім того, повідомляється, що NO^{\bullet} індукує апоптоз шляхом збільшення генерації церамідів через активацію каспази-3, індукцію переходу мітохондріальної проникності та активацію системи Fas [48].

Повідомлялося також, що певні антиапоптотичні білки відіграють антиоксидантну роль. Раннє припущення щодо механізму дії Bcl-2 полягало в тому, що він пригнічує загибель клітин шляхом зменшення генерації реактивних окислювачів, таким чином запобігаючи критичному внутрішньоклітинному окисленню, яке є необхідним для завершення апоптотичної програми. Однак тепер зрозуміло, що зниження АФК, яке спостерігається при надекспресії Bcl-2, ймовірно, є результатом його здатності запобігати втраті цитохрому c з мітохондрій. Тим не менш, цікаво відзначити, що окремі дослідження показують, що клітини з гіперекспресією Bcl-2 мають вищі рівні загального клітинного GSH. Вважається, що продукт гена p35 бакуловірусу, потужний антиапоптотичний білок, відіграє антиоксидантну роль і захищає від багатьох стимулів апоптозу, включаючи відміну фактора росту, лікування ставроспорином, глюкокортикоїдами та актиноміцином-D, і є каспазою широкого спектру дії. інгібітор. Однак інгібування каспази може бути не єдиним механізмом цитопротекції p35. Експресія гена p35 пригнічує H_2O_2 -індукований апоптоз у клітинах комах і може діяти як поглинач для вільних радикалів [49].

Однак повідомляється, що АФК також перешкоджають програмі загибелі апоптозу, змушуючи клітини прийняти альтернативний спосіб загибелі клітин. Апоптозна загибель клітин може бути переключена на некроз під час окисного стресу за допомогою двох можливих механізмів: інактивації каспаз

або падіння рівня АТФ у клітинах. Каспази містять цистеїновий нуклеофіл активного центру, який схильний до окислення або алкілювання тіолів, а також S-нітрозилювання. Це призводить до їх інактивації, перемикає режиму загибелі клітин на некроз. NO^\bullet може діяти як молекулярний перемикач для контролю функції білка через реактивні тіолові групи. Наприклад, NO^\bullet - опосередковане інгібування апоптозу в більшості випадків пов'язане з прямим інгібуванням активності каспаз через S-нітрозилювання цистеїну активного центру, який зберігається в усіх каспазах, хоча непрямий вплив на каспази також може бути компонентом токсичності в певних системах. Перехід від апоптозу до некрозу також може відбутися через падіння клітинного рівня АТФ, спричинене збоєм виробництва мітохондріальної енергії оксидантами. Як згадувалося раніше, АФК можуть забезпечувати загальний зв'язок між сигналами клітинного стресу та ініціацією аутофагії, а накопичення АФК, як повідомлялося, призводить до інактивації цистеїнової протеази АТG4, що, у свою чергу, спричиняє накопичення попередника АТG8-фосфоетаноламіну, необхідного для ініціація утворення аутофагосом. У більшості випадків індукція аутофагічної відповіді служить стратегією, яка повинна забезпечити виживання клітини [49]. Проте за певних умов це також може призвести до загибелі клітин, хоча молекулярні детермінанти, які можуть контролювати перехід від виживання до смерті, все ще погано визначені. Насправді, у відповідь на кілька протипухлинних препаратів АФК можуть викликати аутофагічну загибель клітин.

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ТА СТРУКТУРНИХ ЗМІН У КЛІТИНАХ

2.1.Метаболомічне дослідження метаболічних змін у ниркових клітинах у відповідь на вплив високого вмісту глюкози на основі рідинної або газової хроматографії в поєднанні з мас-спектрометрією

Метаболоміка — це аналітична техніка для вивчення метаболічних шляхів шляхом дослідження загальних змін малих метаболітів у рідинах або тканинах організму після екзогенної стимуляції або генної мутації в біологічних системах. Серед них виявлення біомаркерів і визначення змін вмісту при формуванні та прогресуванні захворювання .

Діабетична нефропатія (ДН) є одним із найсерйозніших мікросудинних ускладнень і основною причиною смерті при цукровому діабеті (ЦД).

Знаходження біомаркерів для прогнозування виникнення та розвитку ДН має значне клінічне значення для його профілактики, діагностики та лікування. У цьому дослідженні вченими (Лян Ван, Янь Ду , Бін-джу Сю, Сюй Ден)була розроблена ультраефективна рідинна хроматографія на основі метаболомії нецільової клітини в поєднанні з квадрупольною часпролітною мас-спектрометрією та газовою хроматографією виконано динамічні метаболічні профілі ниркових клітин щурів, включаючи епітеліальні клітини ниркових каналців (NRK-52E) і мезангіальних клітин клубочка (HBZY-1) у відповідь на високий рівень глюкози в моменти часу 12 год, 24 год, 36 год і 48 год.

Потім деякі потенційні біомаркери були перевірені за допомогою клінічних зразків плазми, зібраних у 55 здорових добровольців, 103 пацієнтів із цукровим діабетом та 57 пацієнтів із діабетичною нефропатією. Для аналізу даних були використані статистичні методи, такі як аналіз головних компонентів і частковий метод найменших квадратів до прихованого структурно-дискримінантного аналізу[50].

LC-MS Аналіз метаболічного профілю

Аналіз UPLC-Q/TOF-MS/MS проводили за допомогою системи 1290 від Agilent (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія, США) у поєднанні з квадрупольним часпролітним мас-спектрометром Agilent 6550, обладнаним ортогональною іонізацією електророзпиленням. (ESI) джерело (Agilent Jet Stream, AJS). Аналіз метаболомічного профілю проводили на колонці Fortis ($2,1 \times 100$ мм, 1,7 мкм) з використанням 0,1% (об./об.) водного розчину мурашиної кислоти (А) та 0,1% (об./об.) розчину ацетонітрилу мурашиної кислоти (В) як рухома фаза з градієнтною програмою: 5–45% В за 0–3 хв, 45–65% В за 3–10 хв, 65–95% В за 10–12 хв і 95% В за 12–14 хв. хв. Перед кожним прогоном колонки повторно врівноважували протягом 11 хв з використанням початкового складу розчинника. Швидкість потоку встановлювали постійною на рівні 0,3 мл/хв, а температуру колонки підтримували на рівні 40°C для всіх розділень. Два мікролітри розчину зразків вводили для кожного аналізу, а дослідження метаболомічного профілю був досягнутий у позитивному режимі. Умови роботи МС: капілярні напруги 4000 В; тиск небулайзера, 28 psi; витрата осушувача 12 л/хв, температура осушувача 350°C; температура оболонкового газу 400°C; і потік оболонкового газу 12 л/хв. Усі аналізи проводили в режимі повного сканування, а діапазон отриманої маси становив від m/z 50 до m/z 1000 [50].

ГХ-МС аналіз метаболомічного профілю

Аналіз ГХ-МС проводили за допомогою системи ГХ Agilent 7890А, поєднаної з одноквадрупольним мас-спектрометром Agilent 5975С, оснащеним електронною іонізацією (ЕІ). Аналіз метаболомічного профілю проводили на колонці Agilent HP-5MS-UI (60 м \times 0,25 мм внутр., товщина рідкої плівки 0,25 мкм). Як газ-носій використовували гелій зі швидкістю потоку 1,0 мл/хв. Температура інжектора становила 280°C, і підготовлений зразок (1 мкл) вводили в режимі без розщеплення. Початкову температуру колонки підтримували на рівні 70°C протягом 1 хв, потім підвищували зі

швидкістю 10°C/хв до 150°C і витримували при цій температурі протягом 2 хв, потім підвищували зі швидкістю 20°C/хв до 300°C і витримують при цій температурі протягом 6,5 хв. Енергію джерела ЕІ встановлювали на 70 еВ, а діапазон повного сканування становив від m/z 40 до m/z 600. Температуру джерела встановлювали на 230°C [50].

2.2.Метаболічні зміни при інфікуванні епітеліальних клітин респіраторно-синцитіальним вірусом

Актуальність метаболомічних досліджень все більше визнається в багатьох областях досліджень, включаючи взаємодію хазяїн-патоген. Відповідно, вплив вірусної інфекції на метаболізм господаря було проаналізовано для кількох ДНК та РНК вірусів .

Респіраторно-синцитіальний вірус людини (HRSV) — це одноланцюговий РНК-вірус з негативною оболонкою, що належить до родини *Pneumoviridae* [51]. HRSV інфікує людей будь-якого віку, але важкі патології (бронхіоліт і пневмонія) спостерігаються переважно у немовлят, людей похилого віку та дорослих з ослабленим імунітетом . Нещодавні дослідження показали, що в усьому світі HRSV спричиняє понад 33 мільйони інфекцій нижніх дихальних шляхів (LRTI) на рік у дітей віком до п'яти років, що призводить до приблизно 3 мільйонів госпіталізацій і приблизно 60 000 смертей. HRSV-інфекція також пов'язана з розвитком астми та загостренням хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) . На даний момент не існує ліцензованої вакцини проти даного вірусу або ефективного лікування проти нього. Гуманізоване нейтралізуюче моноклональне антитіло (Palivizumab, Synagis), спрямоване на злитий білок F вірусу, використовується в осіб із високим ризиком, але воно ефективне лише при профілактичному введенні [52].

Транскриптомні та протеомні дослідження показали глибокий вплив HRSV на фізіологію респіраторних епітеліальних клітин, їх головних мішеней для інфекції. Однак більшість цих досліджень були зосереджені на ранній вродженій імунній відповіді, викликаній в інфікованих клітинах [53]. Хоча також повідомлялося про зміни в інших аспектах взаємодії вірусу та клітини-хазяїна, включаючи ті, що стосуються росту клітин, організації цитоскелету та мітохондріального транспорту електронів. Метаболічні дослідження можуть доповнювати транскриптомний та протеомний аналіз, відкриваючи нові аспекти взаємодії вірусу та хазяїна і, отже, нові потенційні стратегії втручання. Метаболомічні аналізи інфекції HRSV були проведені зовсім нещодавно, в основному в біологічних рідинах інфікованих пацієнтів. Альтернативою аналізу біологічних рідин від таких осіб є використання клітинних моделей у більш контрольованих експериментальних умовах, таких як культивовані клітини, які безпосередньо підтримують весь цикл реплікації вірусу.

Хроматографію проводили з використанням системи ACQUITY I-Class UPLC (Waters Corporation, Мілфорд, Массачусетс, США). Мас-спектрометр був Bruker maXis Impact QTOF (Bruker Daltonics, Бремен, Німеччина). Програмне забезпечення, що використовувалося для керування приладом і отримання даних HR-TOF-MS, було HyStar 3.2 (Bruker Daltonics) і OTOFcontrol 3.4 (Bruker Daltonics).

Мас-спектрометрію проводили за допомогою HR-TOF-MS в режимі позитивної та негативної іонізації електророзпиленням шляхом широкосмугової дисоціації, викликаній зіткненнями (bbCID). Діапазон m/z становив 50–1200. Для розпилювача, сушильного газу та зіткненого газу використовувався азот. Дані про високу та низьку енергію зіткнення були зібрані одночасно шляхом чергування між «повним скануванням» MS та умовами bbCID. Перед кожною послідовністю прилад калібрували зовні за допомогою 10 мМ розчину формиату натрію. Суміш готували шляхом

додавання 0,1 мл мурашиної кислоти та 0,5 мл гідроксиду натрію до водного розчину ізопропанол/Milli-Q (1:1, об'єм/об'єм)[54].

2.3.Клітинний метаболічний стрес: розгляд того, як клітини реагують на надлишок поживних речовин

Поживний стрес зазвичай розглядається з точки зору того, як клітини виявляють і реагують на недостатнє надходження поживних речовин для задоволення своїх біоенергетичних потреб. Однак клітини також відчувають стрес в результаті надлишку поживних речовин, під час якого виробництво активних форм кисню (АФК) перевищує необхідне для нормальних фізіологічних реакцій. Це може статися через активацію онкогену або хронічний вплив факторів росту в поєднанні з високим рівнем поживних речовин. У результаті розвинулися численні механізми, які дозволяють клітинам виявляти та адаптуватися до підвищених рівнів внутрішньоклітинних метаболітів, включаючи: стимулювання сигналізації та проліферації АФК, амінокислотно-залежну активацію mTOR та регуляцію сигналізації та транскрипції через чутливий до метаболіту білок модифікації [55].

Як дефіцит, так і надлишок поживних речовин можуть спричинити клітинний стрес.

Виробництво мітохондріальних АФК з ланцюга транспортування електронів збільшується у відповідь або на гіпоксію, або на активацію онкогену та надлишок поживних речовин. Інші мітохондріальні джерела АФК, такі як проліноксидаза, також беруть участь у відповідях на стрес. На низьких рівнях виробництво АФК має вирішальне значення для нормальних фізіологічних процесів, таких як проліферація та диференціація, через регуляцію передачі сигналів. На більш високих рівнях АФК можуть викликати зміни, які сприяють розвитку раку, такі як мутація ДНК, тривала передача сигналів і

активація запальних шляхів. Високий рівень ROS також може призвести до незворотного пошкодження клітинних компонентів і загибелі клітин.

Клітинний окислювально-відновний гомеостаз і запальний статус також регулюються розгорнутою білковою відповіддю (UPR) у відповідь на стрес ER, спричинений такими факторами, як дефіцит або надлишок поживних речовин. UPR опосередковується в основному трьома білками, асоційованими з ER-мембраною, PERK, IRE1 і ATF6, які разом знімають стрес ER, зменшуючи трансляцію білків і сприяючи згортанню білків і деградації неправильно згорнутих білків. Запальні шляхи перетинаються з UPR за допомогою багатьох механізмів; кожна з трьох гілок UPR була причетна до активації NF- κ B, а JNK може бути активована через IRE1 α . Адаптація до окислювального стресу може частково регулюватися UPR через PERK-залежну активацію Nrf2, фактора транскрипції, який індукує експресію антиоксидантного гена. Маркери стресу ER змінюються при раку, і є суттєві докази, що вказують на участь стресу ендоплазматичного ретикулуму у розвитку раку[56].

Як вже зазначалось вище, зміни в клітинному метаболізмі сприяють розвитку та прогресуванню раку кількома різними способами. Чи всі ці метаболічні зміни опосередковуються виключно клітинними автономними механізмами, такими як онкогенні мутації, чи може надмірне харчування на рівні організму також сприяти розвитку раку? Епідеміологічні дані чітко вказують на те, що можливо ожиріння пов'язане з підвищеним ризиком кількох типів раку, причому відсоток випадків, пов'язаних із надмірною вагою та ожирінням, у Сполучених Штатах і Європі оцінюється у понад 20% для кількох типів пухлинних захворювань та між 40–60% для раку ендометрія та стравоходу. Було запропоновано декілька механізмів для пояснення зв'язку між метаболічними захворюваннями та карциномою, зокрема гіперінсулінемією та хронічним запаленням низького ступеня. Оскільки резистентність до

інсуліну розвивається у людей з ожирінням, секреція інсуліну бета-клітинами підшлункової залози компенсується, що викликає гіперінсулінемію.

Ожиріння також пов'язане зі станом хронічного запалення низького ступеня, ймовірно, внаслідок змін, спричинених надлишком поживних речовин, таких як виробництво мітохондріальних АФК та ER стрес. Зараз добре встановлено, що запалення, пов'язане з ожирінням, є ключовим посередником інсулінорезистентності. Враховуючи очевидну роль, яку хронічне запалення відіграє в розвитку раку, цілком зрозуміло, що запалення, пов'язане з надмірною вагою, також може сприяти такому захворюванню[57].

2.4. Структурно-функціональні зміни клітинних компонентів за допомогою електронної мікроскопії

Скануюча (SEM) і просвічуюча електронна мікроскопія (TEM) є двома основними мікроскопічними методами, які широко застосовуються в біологічних дослідженнях для вивчення ультраструктурних компонентів клітини. За допомогою цих методів, особливо TEM, можна виявити та кількісно визначити морфологічні та ультраструктурні параметри внутрішньоклітинних органел (мітохондрій, апарату Гольджі, лізосом, пероксисом, ендосом, ендоплазматичної сітки, цитоскелету, ядра та ін.) у нормі та при патології. Дослідження компартменталізації внутрішньоклітинних везикул викликає ще більший інтерес у світлі важливості внутрішньоклітинної локалізації медіаторів передачі сигналів у викликанні різних біологічних реакцій. Вивчення морфології деяких внутрішньоклітинних органел може надати інформацію про біоенергетичний статус клітин. TEM також відіграє ключову роль у визначенні різних типів запрограмованої смерті клітин. Насправді візуалізація аутофагосом і аутофаголізосом є важливою для визначення виникнення аутофагії (а також для відрізнення мікроаутофагії від макроаутофагії), тоді як наявність

фрагментованих ядер і поверхневих пухирців характерна для апоптозу. SEM особливо корисний для вивчення морфологічних особливостей клітин і, отже, може пролити світло, наприклад, на взаємодію між клітинами [58].

2.5. Роль електронної мікроскопії у вивченні континууму змін мембранних структур під час поліовірусної інфекції

Інфіковані поліовірусом клітини демонструють чіткі морфологічні зміни під час інфікування. Загалом, під час ранньої інфекції дані світлової мікроскопії показують втрату хроматину в центральній частині ядра, і хроматин, здається, конденсується поблизу ядерної мембрани. При 2,5 hpi за допомогою електронної мікроскопії спостерігають спричинене поліовірусом виділення з мембрани ендоплазматичного ретикулуму, а при 3–3,5 hpi у цитоплазмі з'являються везикули. Велику кількість цитоплазматичних тілець, які спочатку називали «тільцями U», вперше спостерігали за допомогою електронної мікроскопії при 4–7 hpi. Везикули стають більш численними в ході інфекції, доки цитоплазма не заповнюється ними, як видно за допомогою електронної мікроскопії тонких зрізів клітин. Індуковані вірусом везикули, як правило, мають гладкі стінки, розміри яких коливаються від 50 до 200 нм у діаметрі. Наприкінці інфекції, 7,5–9 hpi, клітини округлюються, а цитоплазма має малі та великі прозорі вакуолі [59]. Крім того, ядро ще більше спотворюється, і його важко розрізнити, мітохондрії роздуті, а тільця U більше не видно. Жодних подальших змін у клітинній ультраструктурі після цього часу та до лізису клітин не спостерігається, вченими було припущено, що значні зміни в морфології клітини понад 7 hpi є ознакою порушення всіх фізіологічних систем у клітині, а не пов'язані з реплікацією вірусу [60].

Морфологічні деталі індукованих вірусом мембран під час інфекції

Перші морфологічні зміни всередині інфікованої клітини помітні в ER при 2,5 hpi . Різкі клітинні зміни спостерігаються при 3 hpi. У 1965 році вчений Далес та ін. [61] показали появу одномембранних везикулярних тілець у перинуклеарній ділянці цитоплазми в інфікованих клітинах при 3 hpi. Зовсім нещодавно дослідник Білов та ін. [62] зібрали тривимірні дані та показали те, що виглядало як везикули у двох вимірах, насправді є взаємопов'язаними розгалуженими трубчастими структурами. Окрім появи одномембранних трубчастих структур, сам ендоплазматичний ретикулум зазнав трансформації на 3 hpi. Люменальний простір в ендоплазматичному ретикулумі розширюється, утворюючи структури, описані Маттерном і Деніелом як «ядерні екструзії» . Ці розширені, змінені структури, що походять від ендоплазматичного ретикулуму, виглядають поруч із новоутвореними перинуклеарними мембранними структурами. Можливо уявити, що везикули, індуковані поліовірусом, походять від таких ядерних екструзій.

До 1996 року Шлегель та ін. [63] змогли досягти покращеного збереження зразків за допомогою заморожування під високим тиском . Їхні дані показують структури, подібні до тих, що спостерігалися в попередніх дослідженнях, з видимими додатковими деталями. Особливо помітні подвійні мембранні структури, збережені дубильною кислотою. Везикули, які спостерігали ці дослідники, 5 hpi суттєво відрізняються від тих, що помічали при 3 hpi. У той час як одномембранні везикули все ще видно на 5 hpi, у цитоплазмі спостерігались наявні численні кластери індукованих поліовірусом везикул, які змінюються за розташуванням від перинуклеарних до периферичних. Везикули в цих скупченнях переважно круглі або овальні і часто демонструють подвійну мембранну морфологію. Науковці зазначають, що деякі з цих везикул демонструють люменальний вміст із підвищеною щільністю порівняно з цитоплазмою.

Ще більш вражаючим є те, що деякі з цих подвійних мембранних морфологій не є повністю закритими, а натомість зберігають підковоподібний вигляд із закритим просвітом, який з'єднаний із цитоплазмою через шийку діаметром приблизно 15 нм. Тільця U можуть представляти перехідний стан від одномембранних везикул до двомембранних або навпаки, але це ще не ясно.

На 7 hpi, є більше подвійних мембранних везикул, а також менше одномембранних везикул. Зміни не настільки драматичні від 5 до 7 hpi, як від 3–5 hpi, але капсиди вірусу поліомієліту видно, розсіяні в скупченнях везикул, іноді з'являючись у вигляді кристалів, і часто в просвіті везикул з подвійною мембраною.

Дані електронної томографії Білова та ін., 2012 виявили, що тривимірна морфологія везикул поліовірусу є навіть складнішою, ніж те, що було візуалізовано у двох вимірах. При 3 hpi везикули в цитоплазмі складаються з гіллястих скупчень одномембранних везикул неправильної форми. Діаметри окремих везикул коливаються приблизно від 25 до 300 нм. Ці трубчасті везикули виглядають щільно скупченими, на їх морфологію впливають сусідні везикули. При 4 hpi окремі везикули здаються більшими за об'ємом, і деякі з них мають асоційовані віруси на цитоплазматичній стороні. При 7 hpi більшість везикулярних структур складаються з подвійних мембранних везикул з щільно прилеглими мембранами. Ці більш овальні структури, здається, краще розділені та менш заплутані, з більшими внутрішніми областями, ніж мембранні структури, видимі на 3 та 4 hpi. Як зазначено вище, деякі з цих подвійних мембранних структур, мабуть, мають закриті просвіти, з приблизно круглим центральним просвітом діаметром ~250 нм і отвором воріт ~20 нм. [63].

2.6. Наночутлива оптична когерентна томографія для виявлення структурних змін стовбурових клітин

Наночутлива оптична когерентна томографія (nsOCT) — нещодавно розроблений метод, який виявляє нанорозмірні структурні зміни в зразках. У цьому дослідженні дослідники вперше демонструють здатність nsOCT відображати гранули MSC після мічення різними концентраціями подвійних плазмонних золотих нанозірок. В даному експерименті науковці показують, що середній просторовий період гранул MSC збільшується після мічення зі збільшенням концентрації нанозірок [64].

У цьому дослідженні було використано чотири експериментальні групи. Перші три спрямовані на оцінку здатності nsOCT розрізняти MSC, мічені різними концентраціями нанозірки. Для експерименту вчені підготували першу та другу експериментальні групи для перевірки відтворюваності результатів за різних умов. Перша складалася з дев'яти гранул MSC від одного донора. Серед цих зразків є три повтори, кожна з яких містить немічені клітини і мічені концентрацією нанозірочок 100 пМ, і клітини, мічені концентрацією нанозірочок 400 пМ, усі в культурі гранул. Друга група складалася з трьох зразків MSC від одного донора, інкапсульованих в альгінат натрію. Три зразки являють собою MSC без маркування, мічені концентраціями нанозірочок 100 пМ і 400 пМ. Третя експериментальна група складається з MSC у культурі гранул від трьох різних донорів. Науковці підготували п'ять гранул MSC від кожного донора, одну контрольну та чотири інші, мічені різними концентраціями (100 пМ, 200 пМ, 300 пМ і 400 пМ) нанозірочок. Четверта експериментальна група була розроблена для вивчення потенціалу nsOCT для виявлення морфологічних змін, пов'язаних з різними стадіями хондрогенної диференціації стовбурових клітин. У цій групі підготували MSC від трьох різних донорів у культурі гранул. Від кожного донора виготовили п'ять зразків, що представляють різні стадії хондрогенної диференціації (контроль, день 1, день 4, день 7 і день 21). Для

кореляції з результатами nsOCT експериментальних груп 1 і 4 виконали відповідну трансмісійну електронну мікроскопію та гістологічні зображення відповідно.

Для проведення даної методики були обрані золоті нанозірки, що складаються зі сферичного ядра та кількох гілок. Ці нанозірки спочатку були розроблені як контрастна речовина для фотоакустичного зображення. Вони можуть локалізувати електронну густину на своїх гострих кінчиках, таким чином максимізуючи ефективну площу поперечного перерізу для взаємодії з фотонами [65]. Крім того, анізотропні наночастинки, такі як золоті нанозірки, мають унікальні оптичні властивості для біологічного зображення у другому ближньому інфрачервоному вікні. Під час мічення стовбурових клітин контрастними речовинами вкрай важливо переконатися, що їх життєздатність, диференціація, міграція та терапевтичний потенціал не порушені. Уданому дослідженні науковці використовують золоті нанозірки, які були синтезовані за допомогою методу опосередкованого росту насіння при кімнатній температурі з подальшим додаванням розчину HS-PEG-COOH для пегілювання золотих нанозірок з карбоксильними групами. Нанозірки мають гідродинамічний розмір 92 нм. Гідродинамічні вимірювання проводилися за допомогою Anton Paar Litesizer 500, який використовує принцип динамічного розсіювання світла з використанням трьох кутів виявлення (бічне, зворотне або переднє розсіювання). Кут для розсіювання світла вибирався приладом автоматично, і для вимірювання було проведено 60 прогонів.

MSC людини були виділені з кісткового мозку після аспірації кісткового мозку з гребеня клубової кістки здорових донорів. Клітини були виділені на основі пластичної адгезії в культурі та розмножені в альфа-мінімальному есенціальному середовищі з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки, 1% пеніциліну/стрептоміцину та 1 нг/мл рекомбінантного основного фактора росту фібробластів людини. Усі клітини були охарактеризовані перед

використанням відповідно до Міжнародного товариства клітинної та генної терапії (ISCT) [66]. Був проведений проточний цитометричний аналіз, щоб підтвердити, що MSC були позитивними щодо CD105, CD73 та CD90 та негативними щодо експресії поверхневих антигенів CD3, CD34, CD14, CD45, CD19 та HLA-DR, а також здатні диференціюватися до адипогенних, остеогенних та хондрогенних ліній. за допомогою описаних раніше методів. Клітини розмножували до пасажу 3 і мітили 100 пМ, 200 пМ, 300 пМ або 400 пМ нанозірочками протягом 24 годин. Немічені контролю також готували та витримували в культурі протягом 24 годин. Клітини промивали для видалення залишків нанозірочок, збирали та підраховували. Потім для кожного з трьох умов готували клітинні гранули, кожна гранула містила 250 000 клітин. Гранули витримували в хондрогенному середовищі протягом 7 днів. Це було зроблено не для того, щоб викликати повну диференціацію, а для того, щоб забезпечити початок етапу конденсації для підтримки тривимірної структури, яка не буде дисоціювати під час підготовки до візуалізації. Для кожного зразка було підготовлено три технічні повтори для оцінки потенційної мінливості між гранулами.

Для отримання OCT зображень використовувалася комерційна система спектральних доменів Telesto 3 від Thorlabs, Inc., Нью-Джерсі, США. Система має спектральну смугу від 1180 нм до 1415 нм з центром на 1295 нм. Спектрометр оснащений 2048-піксельним ПЗЗ-детектором. Специфікації дозволяють осьову роздільну здатність $5,5\mu\text{m}$ і глибиною зображення 3,6 мм у повітрі. Об'єктив LSM03 використовувався для всіх зображень у цьому дослідженні. Лінза об'єктива має числову апертуру 0,055 і бічну роздільну здатність $13\mu\text{m}$. Зображення було отримано на частоті 76 кГц із обіцяною чутливістю 96 дБ. Для експериментальних груп 1, 2 і 3 були отримані тривимірні об'єми з 500 пікселями кожен у бічних напрямках (0,5 мм x 0,5 мм). Для експериментальної групи 4 ми отримали зображення з 300 пікселями в кожному бічному напрямку (0,3 мм x 0,3 мм) [67].

2.7. Моніторинг структурної модуляції редокс-чутливих білків у клітинах за допомогою MS-CETSA

Активні форми кисню (АФК) індують різні реакції клітинного стресу, але також можуть опосередковувати клітинну передачу сигналів. Підвищені рівні АФК пов'язані зі старінням, раком, а також різними метаболічними та неврологічними розладами. АФК також можуть впливати на ефективність і побічні ефекти ліків. Незважаючи на те, що білки є ключовими медіаторами більшості ефектів АФК, прямі дослідження функції білка, модульованого активною формою кисню, у клітинному контексті є дуже складним завданням. Тому розуміння специфічних ролей різних білків у клітинних реакціях ROS все ще є відносно рудиментарним. У цій роботі дослідники показують, що аналіз мас-спектрометрії клітинного теплового зсуву (MS-CETSA) може безпосередньо контролювати АФК та редокс-модуляції структури білка на рівні протеома. Змінюючи рівень АФК у культивованих лізатах клітин гепатоцелюлярної карциноми людини та інтактних клітинах, вчені виявили відповіді CETSA у багатьох білках, які, як відомо, є окисно-відновними, а також виявили нові чутливі до АФК білки. Дослідження на інтактних клітинах, оброблених перекисом водню та сульфасалазином, препаратом, що модулює АФК, виявили не лише білки, які безпосередньо модифіковані, але й білки, що відповідають за клітинні ефекти. Значні зміни спостерігаються в протеїнах, що обмежують швидкість, що регулюють ключові клітинні процеси, включаючи відомі системи окисно-відновного контролю, деградацію білків, епігенетичний контроль і процеси трансляції білків. Цікаво, що узгоджені зсуви на АТФ-зв'язуючих білках виявили окисно-відновну модуляцію рівнів АТФ, яка, ймовірно, контролює багато клітинних процесів. У сукупності ці дослідження встановлюють CETSA як новий метод клітинних досліджень окисно-відновної модуляції білків [68].

Для обробки лізатом глутатіону ITRR 250 мкг клітинних лізатів HepG2 на реакцію інкубували з десятьма різними співвідношеннями GSSG/GSH (1:100,

1:20, 1:10, 1:5, 1:2, 1: 1, 2:1, 5:1, 10:1, 100:1) у кінцевій концентрації, еквівалентній загальним 5 мМ глутатіону та 50 мкл реакційного об'єму протягом 1 хвилини при кімнатній температурі. Для обробки лізатом H_2O_2 ITDR однакову кількість білкових лізатів і реакційний об'єм інкубували з десятьма різними концентраціями H_2O_2 (найвища доза 50 мМ, градієнт, утворений з коефіцієнтом розведення 4) протягом 1 хв. Експеримент ITDR проводився з використанням 1 мільйона клітин НерG2 на реакцію, де живі клітини, суспендовані в 50 мкл повного культурального середовища клітин, інкубували з градієнтом концентрації (таким самим, як той, який використовувався при обробці лізату H_2O_2 ITDR) розчинів H_2O_2 протягом 10 хв в 5% CO_2 інкубаторі. Оброблені клітини ретельно промивали PBS для підготовки зразка CETSA. Внутрішньоклітинний експеримент ITDR з олігоміцину проводили з використанням 1 мільйона клітин SNU398 на реакцію, де живі клітини обробляли десятьма дозами олігоміцину (найвища доза 100 мкМ, градієнт, утворений з коефіцієнтом розведення 5) у присутності середовища для культури клітин для 1 год у 5% CO_2 інкубатор. Внутрішньоклітинний експеримент із сульфасалазином ITDR проводився подібним чином (найвища доза 250 мкМ, градієнт, утворений із коефіцієнтом розведення 4) на прикріплених клітинах НерG2 у повному середовищі протягом 4 годин в інкубаторі з 5% CO_2 . Внутрішньоклітинну обробку сульфасалазином ITTR проводили з використанням 1 мільйона клітин НерG2, культивованих у достатній кількості повного середовища протягом 24 годин. Додавання сполуки планувалося в різні моменти часу, і всі клітини збирали в одній кінцевій точці. Оброблені адгезивні клітини збирали обережним зіскрібком, промивали PBS і готували для подальшого приготування зразка MS-CETSA [69].

Для вимірювань CETSA всіх зразків ITRR, ITDR та ITTR зазвичай вибирали 52 °C як температуру нагрівання, і отримували біологічні дублікати. Для того,

щоб переконатися, що застосовувані сполуки не призведуть до глобального спотворення зразків білка, було проведено одне вимірювання при 37 °С як контроль рівня білка в експериментах ITRR та ITDR. В експерименті ITTR зразки при 37 °С були підготовлені в біологічних дублікатах, щоб впевнено вимірювати зміни кількості білка з часом [70].

LC-MS аналіз

Фракції зразка пептидів висушували та ресуспендували в 1:99 ацетонітрил:вода, що містить 0,5% (об./об.) оцтової кислоти та 0,06% TFA. 2 мкг пептидів на фракцію вводили в систему Dionex UltiMate 3000 UPLC, з'єднану з мас-спектрометром Q Exactive HF (ThermoFisher Scientific).

Розділення проводили на аналітичній колонці 50 см × 75 мкм EASY-Spray (ThermoFisher Scientific) із попередньо запрограмованим градієнтом шляхом змішування розчинника А (0,1 % мурашиної кислоти у воді) та розчинника В (0,1 % мурашиної кислоти в ацетонітрилі) протягом 70 хв. Дані MS були отримані за допомогою 12 найпопулярніших протоколів збору даних, що залежать від даних, із роздільною здатністю 60 000 у MS1 і 45 000 у MS2.

Необроблені дані MS аналізували в програмному забезпеченні Proteome Discoverer 2.1 (ThermoFisher Scientific) для ідентифікації та кількісного визначення пептидів і білків, використовуючи як Mascot 2.6.0 (Matrix Science), так і Sequest HT (ThermoFisher Scientific). Отримані пептидні послідовності були зіставлені з перевіреною базою даних протеомів людини, завантаженою з Uniprot, що містить 42105 записів послідовностей [71].

РОЗДІЛ 3

ВИВЧЕННЯ МЕХАНІЗМУ АДАПТАЦІЙНИХ ЗМІН У КЛІТИНАХ В УМОВАХ СТРЕСУ

3.1. Дослідження метаболічних змін у ниркових клітинах у результаті впливу високого вмісту глюкози за допомогою рідинної або газової хроматографії в поєднанні з мас-спектрометрією.

У цьому дослідженні науковцями було проведено багатоплатформний метаболомічний експеримент за допомогою UHPLC-Q/TOF-MS/MS та GC-MS для динамічних змін метаболітів у ниркових клітинах у відповідь на високий рівень глюкози. Деякі потенційні біомаркери, отримані в метаболоміці, були просто перевірені за допомогою клінічних зразків.

Діабетична нефропатія є одним із основних ускладнень цукрового діабету, який є групою метаболічних синдромів, що характеризується поступовим підвищенням рівня глюкози крові. Походження ДН досі не з'ясований.

Загальноприйнято вважати, що в патогенезі вказаного захворювання беруть участь численні фактори, такі як гіперглікемія, порушення гемодинаміки, окислювальний стрес і запальні реакції. У процесі прогресування від цукрового діабету до діабетичної нефропатії в організмі відбуваються зміни в структурах дрібномолекулярних метаболітів, які можуть відігравати певну роль у виникненні та розвитку ЦБ.

У цьому дослідженні вперше була проведена нецільова клітинна метаболоміка, і отримані результати свідчать про те, що в цьому процесі беруть участь постійні зміни малих молекулярних метаболітів, таких як ліпіди, жирні кислоти, амінокислоти, вуглеводи та нуклеозиди. У цих потенційних біомаркерах жирні кислоти та амінокислоти привернули велику увагу і довели, що вони тісно пов'язані з ЦД або ДН. Таким чином, диференціальні метаболіти зі стійкими змінами, включаючи жирні кислоти (пальмітинова кислота, стеаринова кислота, олеїнова кислота та лінолева кислота) та амінокислоти (гліцин, валін, лейцин та ізолейцин) у клітинному метаболоміці, були додатково обрані як мішені для підтвердження їх клінічної значущості у хворих на діабет або нефропатію. Результати показали, що вміст у плазмі пальмітинової кислоти, стеаринової кислоти, лінолевої

кислоти, валіну, лейцину та ізолейцину значно змінювався у пацієнтів із ЦД або ДН. Однак ці біомаркери, валідовані в досліджуваній плазмі, можуть відображати не тільки пошкодження нирок, але й разом з іншими тканинами, оскільки типи нениркових клітин не використовувалися як контроль.

Дослідження показали, що неетерифіковані жирні кислоти мають певну токсичну дію на β -клітини підшлункової залози, що може призвести до резистентності до інсуліну. Пальмітинова кислота та стеаринова кислота є насиченими жирними кислотами, які відіграють шкідливу роль в організмі людини. Карнітин разом з пальмітиновою кислотою може переноситися в мітохондрії у формі жирного ацилкарнітину для повного β -окислення.

Інсулінорезистентність може пригнічувати це окиснення жирних кислот, що призводить до накопичення пальмітинової та стеаринової кислот у цукровому діабеті або діабетичній нефропатії, що в останньому спричиняє пошкодження нирок [50].

3.2. Спостереження за метаболічними змінами епітеліальних клітин при інфікуванні респіраторно-синцитіальним вірусом.

У цьому дослідженні вчені зосередилися на метаболічних змінах, викликаних HRSV від 0 до 24 годин після інфікування (hpi) епітеліальних клітин. У цьому випадку також спостерігалася закономірність, що залежить від часу, і аналіз головних компонентів (PCA) розділив різні періоди зараження на дві основні групи: ранній-середній (0, 6 і 12 hpi) і пізній (18 і 24 hpi), що також було очевидно на тепловій карті рівнів метаболітів в інфікованих клітинах. Найбільш очікувані зміни відбулися після 18 hpi і включали кілька аспектів клітинного метаболізму. Результати підтверджують ідею про те, що HRSV стимулює центральний метаболізм вуглецю, оскільки декілька метаболітів гліколізу та циклу ТСА були збільшені після 12–18 hpi, включаючи піровиноградну, лимонну, яблучну та оксоглутарову кислоти. Підвищені

рівні глутаміну та глутамінової кислоти, попередників проміжної α -кетоглутарової кислоти циклу ТСА, також спостерігалися пізніше після інфікування. Крім того, інфікування епітеліальних клітин A549 HRSV індукує значні зміни в компонентах комплексів і каналів транспортного ланцюга електронів, як виявлено за допомогою кількісного протеомного аналізу, що підтверджує критичну роль мітохондріального окисного фосфорилування в інфекції HRSV [72].

Високі кількості нуклеотидів і амінокислот необхідні для виробництва вірусних нуклеїнових кислот і білків під час вірусних інфекцій. Результати дослідження показали підвищені рівні нуклеотидів і споріднених сполук на більш пізніх термінах інфікування HRSV, включаючи ATP, UTP, UDP, GTP, CTP, CMP і аденозинфосфосульфат.

Як і у випадку з нуклеотидами, кількість кількох амінокислот збільшувалася переважно при 24 hpi, таких як гістидин, фенілаланін, глутамін, метіонін, лізин, лейцин, триптофан, тирозин і глутамінова кислота

На додаток до виробництва вірусу, варто зазначити, що HRSV індукує потужну клітинну противірусну імунну відповідь [73]. Одночасна активація захисних сил клітини-господаря та висока продукція структурних компонентів для складання віріону призводить до високоанаболічного клітинного стану. Таким чином, підвищені рівні амінокислот і нуклеотидів (зокрема UTP), які спостерігаються тут, можуть бути результатом потреби в синтезі нуклеїнової кислоти та білка HRSV, а також для активації клітинних мРНК і білків, пов'язаних із відповіддю клітини на вірусну інфекцію. .

Інтерферони типу I та II (IFN) є ключовими компонентами імунної відповіді проти вірусних інфекцій. Стає очевидним, що клітинний метаболізм і відповідь IFN тісно взаємопов'язані.

На завершення отриманні дані показують, як інфекція HRSV впливає на клітинний метаболізм, щоб забезпечити адекватне постачання енергії та структурних компонентів для реплікації вірусу. Однак клітини реагують на інфекцію контрзаходами, спрямованими на обмеження росту вірусу.

Маніпуляція метаболізмом інфікованих клітин може бути потенційним підходом до розробки ефективних методів лікування проти цього патогенного мікроорганізму.

3.3. Реакція клітин на надлишок поживних речовин

Високий рівень клітинного метаболізму поживних речовин призводить до виробництва АФК та окислювального стресу, що може сприяти розвитку та прогресуванню раку. Хоча це часто відбувається в результаті активації онкогену, стає очевидним, що надмірне харчування організму також призводить до клітинних стресових реакцій, які сприяють канцерогенезу. Епідемія ожиріння, здається, не вщухає і значно збільшує тягар раку. Наразі ймовірно, що і надмірна вага може сприяти його розвитку через поєднання гіперінсулінемії та хронічного запалення низького ступеня, спричиненого стресом поживними речовинами, причому кожен із цих факторів відіграє меншу або більшу роль у різних типах раку. Цілком ймовірно, що додаткові механізми також беруть участь у зв'язку хронічного надмірного харчування з розвитком і прогресуванням раку. Наприклад, надалі буде цікаво розібратися, як індуковані харчуванням зміни білків клітинної поверхні та їх глікозилювання регулюють реакцію пухлинних клітин на імунні клітини та мікрооточення. Крім того, оцінка того, які конкретні білки диференційовано модифікуються шляхом ацетилювання або O-GlcNAcylation в умовах надлишку поживних речовин, може дати розуміння потенційної ролі цих модифікацій у розвитку раку при ожирінні. За останні кілька років загальні знання про взаємодію між метаболічними та сигнальними шляхами та метаболічними змінами, пов'язаними з раком, різко зросли, що свідчить про

те, що настав час розглянути, як змінений метаболізм сприяє його розвитку в контексті метаболічних захворювань [74].

3.4.Зміни мембранних структур клітин під час поліовірусної інфекції

Під час інфікування вірусом поліомієліту існує континуум мембранних структур, які утворюються разом із збиранням фабрик реплікації та для підтримки реплікації РНК. Індуковані вірусом мембранні структури починають з'являтися при 2,5 hpi і домінують над цитоплазматичним простором на 7 hpi. Ці структури виконують багато ролей в інфікованих вірусом клітинах, у тому числі як місце для реплікації РНК, та для упаковки РНК, а також для дозрівання вірусу [75] . Незрозумілим залишається те, чи переходять мембранні структури між ролями чи утворюються незалежно, але, якщо існують незалежні шляхи формування мембрани для різних вірусних ролей, це може пояснити спостережувану присутність у фабриках реплікації маркерів з різного клітинного походження (ER, апарат Гольджі, тощо).

У клітинному масштабі синтез РНК розрізнений в інфікованих клітинах. Негативна РНК синтезується в перинуклеарній області ER, а (+) РНК – у більш периферичному місці [76]. Незважаючи на те, що упаковка РНК пов'язана з її реплікацією, різна плавуча щільність фракціонованих везикул вказує на те, що упаковка РНК у віріони відбувається в популяції везикул, відокремлених від тих, що активні в реплікації. Це свідчить про просторову компартменталізацію вірусних процесів, де (+) РНК мігрує з мембранного сайту синтезу РНК до мембранних сайтів упаковки. Таким чином, активна реплікація включає лише частину доступних мембранних структур.

На ранніх стадіях інфікування морфологія поліовірусу та інших (+) РНК-вірусів, виробляє одномембранні трубчасті структури . Прогресування структур до подвійних мембранних везикул також є загальним. Докази показують, що реплікація РНК відбувається в просвітних областях везикул

для декількох (+) РНК-вірусів. Ці структури можуть служити для відділення від захисних механізмів клітини-господаря дволанцюгової проміжної РНК під час синтезу РНК. У випадку прототипу артерівірусу, вірусу артеріїту коней, подвійні мембранні везикули, утворені під час інфікування, мітять дволанцюгову РНК. Ці мічені везикули демонструють той самий темний фенотип, що спостерігається в популяції везикул поліовірусу. Аналіз вмісту фосфору за допомогою електронної спектроскопії показує, що ці везикули при артерівірусній інфекції містять вміст фосфору, еквівалентний приблизно дюжині копій вірусного геному. Хоча метод, за допомогою якого продукти РНК можуть виходити з просвіту везикули з подвійною мембраною, незрозумілий для деяких вірусів, інфіковані поліовірусом клітини демонструють можливий проміжний продукт. U-подібні тільця або підковоподібні везикули, які зазвичай спостерігаються на пізніх стадіях поліовірусної інфекції, демонструють закриту морфологію просвіту, яка узгоджується зі злиттям мембран між зовнішніми та внутрішніми везикулами, можливо частково через ЗАВ .

Везикули, подібні до аутофагосом, являють собою великі двомембранні структури, приблизно вдвічі більші за U-тілця. Вони відіграють вирішальну роль у дозріванні вірусів через підкислення везикул, що сприяє останньому етапу дозрівання вірусу та його передачі. Краще розуміння шляхів переходів везикул може допомогти з'ясувати інфекційний цикл і компартменталізацію функції.

Складні клітинні зміни, які відбуваються під час інфікування, вимагають спеціалізованого біосинтезу фосфоліпідів, який розвивається протягом часу інфікування . У вказані науковцями моделі кожна популяція везикул виконує спеціальні ролі і, можливо, деякі спільні ролі, які підтримують процеси реплікації поліовірусу. Різні мембранні види можуть співіснувати тимчасово,

створюючи складне середовище для ефективної координації всіх аспектів реплікації поліовірусу [77].

3.5.Виявлення структурних змін в стовбурових клітинах за допомогою наночутливої оптичної когерентної томографії.

Експериментальні результати показують, що метод nsOCT може розрізнити гранули MSC, мічені різною концентрацією золотих плазмонних нанозірок. Вченим які займалися даним експериментом вдалося помітити, що просторові періоди мають тенденцію до підвищення зі збільшенням концентрації нанозірок. У той час як кілька методів візуалізації використовують нанозірки як контрастну речовину, nsOCT може надати інформацію, яка безпосередньо об'єднана зі структурними змінами, які в свою чергу пов'язані з маркуванням. Нанорозмірна чутливість дозволяє виявляти зміни концентрації нанозірок лише на 100 пМ. Дослідники підтвердили висновки техніки nsOCT, використовуючи відповідні ТЕМ-зображення високої роздільної здатності. Науковцям також вдалося покращили модель диференціації хондрогенезу гранул MSC, забезпечивши більш повний аналіз тенденції структурних змін, які відбуваються під час розвитку хряща з часом. Результати показали, що nsOCT може виявляти нанорозмірні структурні зміни на різних стадіях хондрогенної диференціації стовбурових клітин, які неможливо виявити за допомогою звичайної OCT. Просторовий період збільшувався під час прогресування формування матриці прехрящової конденсації та зменшувався під час її трансформації в збагачену матрицю хряща. Також під час експерименту дослідникам вдалося підтвердили зміни просторового періоду, пов'язані з хондрогенною диференціацією, отримані за допомогою аналізу nsOCT, виконавши аналіз Фур'є на гістологічних зображеннях із відповідних зразків. Підсумовуючи атрибути nsOCT, такі як зображення в реальному часі, висока просторова роздільна здатність, збільшена часова роздільна здатність, нанорозмірна

чутливість до структурних змін і здатність відтворювати зображення протягом тривалого часу, роблять його ідеальним кандидатом для допомоги в терапії стовбуровими клітинами. Хоча nsOCT не потребує маркування, він чутливий до контрастних речовин, таких як нанозірки. Ця нанорозмірна чутливість дозволяє виявляти стовбурові клітини, мічені різними контрастними речовинами. NSOCT можна використовувати як додатковий метод візуалізації разом з іншими методами візуалізації для успішного сприяння новим дослідницьким можливостям, таким як визначення розташування та кількості клітин, візуалізація розподілу стовбурових клітин *in vivo*, відстеження міграції до клітин-мішеней та визначення їх подальшої долі. Основним обмеженням методу є те, що виявлені структурні або морфологічні зміни є неспецифічними порівняно з нелінійними методами візуалізації, які використовують мітки, як-от фотоакустичне зображення або флуоресцентна мікроскопія [78,79,80].

3.6. Результати методики MS-CETSA у спостереженні структурної модуляції редокс-чутливих білків у клітинах.

У цій роботі науковці впровадили та перевірили нещодавно розроблений аналіз клітинного теплового зсуву (CETSA) для вивчення індукованих АФК модуляцій структури та активності білка в клітинному контексті. CETSA — це широкозастосовна техніка без міток, яка спочатку була введена для вивчення взаємодії препарату з цільовими білками в інтактних клітинах і тканинах. Поєднуючи принципи CETSA та кількісної протеоміки на основі мас-спектрометрії (MS), можна зробити більш повну оцінку впливу стабільності на тисячі клітинних білків. Останні розробки ще більше розширили сферу застосування MS-CETSA для виявлення біохімічних взаємодій білків з фізіологічними лігандами (наприклад, іншими білками, нуклеїновими кислотами, метаболітами та кофакторами), демонструючи

потенціал MS-CETSA для вивчення різних внутрішньоклітинних біологічних процесів [71].

Клітини мають здатність відчувати надмірний окислювальний стрес і реагувати, встановлюючи антиоксидантний захист, протидіючи ефектам підвищення рівня АФК. Найпоширенішим і основним внутрішньоклітинним антиоксидантним окисно-відновним буфером є глутатіон, який переміщається між відновленою (GSH) і окисленою (GSSG) формами, щоб збалансувати клітинний окисно-відновний стан. Як правило, окисно-відновні амінокислоти та кофактори цитоплазматичних білків підтримуються у відновленому стані завдяки високій концентрації GSH (1–10 мМ) і високому співвідношенню (100–400:1) між відновленою та окисненою формами [29]. Деякі білки, такі як тіол-дисульфідоксидоредуктази сімейства тіоредоксинів, функціонують шляхом утворення оборотних дисульфідних зв'язків у фізіологічному діапазоні співвідношення GSH/GSSG, таким чином передаючи окисно-відновні еквіваленти для хімічних перетворень.

Помітні зсуви як мітохондріальних, так і цитозольних рибосомальних білків також спостерігаються у внутрішньоклітинних наборах даних, які, ймовірно, відображають специфічну модуляцію активності трансляції білка. Це узгоджується з дослідженнями, які підтверджують окисно-відновний контроль трансляції. Однак вчені не можуть розрізнити, чи зрушення CETSA пов'язані з прямими окислювально-відновними модуляціями рибосомальних білків, чи з низхідними ефектами від інших взаємодій, таких як зміни в концентраціях АТФ і ГТФ, які також, як відомо, контролюють трансляційну активність.

Таким чином, ця робота підтверджує, що структурні зміни внаслідок окисно-відновних модифікацій можна виявити для багатьох білків за допомогою CETSA. Робота також надає першу чернетку білків, які повідомляють про

такі зміни, тобто редоксому CETSA. Окисно-відновні модуляції білків, як відомо, важко вивчити безпосередньо в інтактних клітинах, але CETSA тепер надає новий шлях для прямих та інтерактивних досліджень окисно-відновних процесів у різних клітинних системах. Деякі зрушень, висвітлених у цій роботі, стосуються модуляції активності ключових окисно-відновних контрольних білків, і ці зрушення тепер можуть бути безпосередньо застосовані як біомаркери в дослідженнях АФК або інших окисно-відновних ефектів. Оскільки як прямі взаємодії, так і наступні ефекти видно в клітинних даних, буде потрібна подальша робота, щоб розібрати походження цих ефектів на багатьох окремих білках однак, вчені передбачають, що з накопиченням даних CETSA про окисно-відновні дослідження з'явиться зв'язок між окислювально-відновними модифікаціями та подальшими ефектами на багато реагуючих білків, подібно до деяких білків у цьому дослідженні. Оскільки MS-CETSA можна застосовувати для досліджень широкого діапазону зразків, включаючи тканини, тепер CETSA також пропонує новий спосіб детального розуміння оперативних аспектів АФК та інших окисно-відновних процесів при конкретних захворюваннях, а також під час терапії [81].

ВИСНОВОК

1. Реакція клітинного стресу – це широкий спектр молекулярних змін, які клітини зазнають у відповідь на стресові фактори навколишнього середовища, такі як екстремальні температури, вплив токсинів і механічні

пошкодження. Реакції клітинного стресу також можуть бути викликані деякими вірусними інфекціями. Різноманітні процеси, задіяні в клітинних стресових реакціях, діють як через короточасні механізми, які мінімізують гостре пошкодження цілісності клітини, так і через довгострокові механізми, які забезпечують клітинам міру їх стійкості до стресу, який служить адаптивній меті захисту клітин від несприятливих умов.

Реакції клітинного стресу в основному опосередковуються білками, які класифікуються як стресові. Такі білки часто поділяють на дві загальні категорії: білки, які активуються лише під час стресу, або ті, які беруть участь як у відповіді на стрес, так і в нормальній клітинній функції. Суттєвий характер цих стресових білків у сприянні виживанню клітини сприяє тому, що вони надзвичайно добре зберігаються у різних групах, будучи майже ідентичними в найпростіших прокаріотичних і найскладніших еукаріотичних клітинах. Протеїни стресу можуть бути широко виражені. У клітині виконуються різні функції як під час нормальних життєвих процесів, так і у відповідь на стрес.

2. Клітини мають внутрішні сигнальні механізми, які здатні розпізнавати різні шкідливі стани, як нормальні, так і патологічні, реагувати на них, посилюючи різні стресові реакції. Прикладами нормальними сигналами є цитокіни, які індукують запальні реакції в клітинах. У багатьох випадках, особливо якщо сигнал стресу не надто сильний, клітина може вижити і навіть стати стійкішою до подальших дій. Якщо клітини у процесі збільшення, то такі сублетальні ушкодження можуть або призвести до тимчасової зупинки росту клітини, щоб дати достатній час для усунення пошкоджень, або процес клітинної проліферації може бути зупинений надовго, і клітина перейде в стан старіння. Іншим прикладом механізму виживання, що еволюційно зберігається, є аутофагія, яка дозволяє клітинам справлятися із цими періодами. Однак, якщо такі стреси стають надто сильними, клітина гине або в результаті процесу некрозу, який є швидким і катастрофічним, або в

результаті повільнішого і контрольованого процесу, який здійснюється за допомогою строго регульованого процесу запрограмованої загибелі клітин відомого як апоптоз.

Хоча морфологічні характеристики некрозу та апоптозу чітко різні, у них є деяка подібність у тому, що вони індукуються подібними стимулами і часто використовують ті самі механізми. Некроз виникає, коли клітина перевантажена ушкодженням та швидко розпадається. Об'єм клітини швидко збільшується, мітохондрії набухають, і плазматична мембрана раптово розривається, викликаючи викид клітинного вмісту в міжклітинні простори, де він може викликати запальну реакцію. І навпаки, апоптоз є набагато більш упорядкованим процесом, оскільки протеази та нуклеази в межах неушкодженої плазматичної мембрани руйнують клітину, яка поступово зменшується у розмірах і потім поглинається сусідніми клітинами, що дозволяє уникнути будь-яких запальних реакцій.

3. У всіх відхиленнях від норми клітинний стрес є або причиною, або наслідком. Отже, він заповнює дуже специфічну нішу, охоплюючи цю неминучу для патології рису в усій її всеосяжності та неоднорідності. Це включає не тільки різні джерела стресу, але й відповідні реакції клітин. Стресові сигнальні каскади є еволюційно збереженими клітинними стратегіями для відновлення гомеостазу та стримування появи патологій. Тривалий або перебільшений стрес, а також нездатність створити антагонізуючу реакцію зрештою призведе до відкнення летальних сигналів, як це часто спостерігається при нейродегенеративних розладах після протеотоксичності. І навпаки, коли клітини ухиляються від загибелі, клітинний стрес сприятиме виникненню злоякісних пухлин, таких як рак. Таким чином, будь-яке розуміння джерела, передачі, молекулярні мішені або внутрішня та зовнішня профілактика клітинного стресу безпосередньо використовуються для розуміння та лікування хворобливих станів. Для цієї мети, вчені і намагаються створити нові методи дослідження для більш

глибшого розуміння таких проблем як: нестабільність геному, пошкодження та відновлення ДНК, точність транскрипції та функціональні РНК, (неправильне) згортання білка та контроль якості, як-от відповідь на тепловий шок, реакція розгорнутого білка та аутофагія, метаболічні аномалії, пошкодження мітохондрій та реакція на окислювальний стрес, старіння та загибель клітин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Calabrese V, Guagliano E, Sapienza M, Panebianco M, Calafato S, Puleo E та ін. Окисно-відновна регуляція реакції клітинного стресу при старінні та нейродегенеративних розладах: роль вітагенів. *Neurochem Res.* 2007 рік; 32 (4-5):757-373. [PubMed] [Google Scholar]

2. Shamaei-Tousi A, Halcox JP, Henderson V. Підкреслюючи очевидне? Клітинний стрес і білки клітинного стресу при серцево-судинних захворюваннях. *Cardiovasc Res.* 2007 рік; 74 (1):19–28. [PubMed] [Google Scholar]
3. Харрісон Е.М., Шарп Е., Беллами К.О., МакНеллі С.Дж., Деві Л., Гарден О.Я. та ін. Агенти, що зв'язують білок теплового шоку 90, захищають клітини нирок від окислювального стресу та зменшують ішемічно-реперфузійне пошкодження нирок. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 рік; 295 (2):397–405. [PubMed] [Google Scholar]
4. Lockshin RA, Zakeri Z. Запрограмована клітинна смерть і апоптоз: витоки теорії. *Nature Reviews Молекулярна клітинна біологія* . 2001; 2 (7):545–550. [PubMed] [Google Scholar]
5. Lockshin RA, Williams CM. Запрограмована клітинна смерть - I. Цитологія дегенерації в міжсегментарних м'язах шовкопряда перного. *Журнал фізіології комах* . 1965 рік; 11 (2): 123–133. [PubMed] [Google Scholar]
6. Lockshin RA, Williams CM. Запрограмована клітинна смерть — V. Цитолітичні ферменти щодо розпаду міжсегментарних м'язів шовкопряда. *Журнал фізіології комах* . 1965 рік; 11 (7): 831–844. [PubMed] [Google Scholar]
7. Пютцер Б.М. Шляхи смерті E2F1 як мішені для терапії раку. *Журнал клітинної та молекулярної медицини* . 2007 рік; 11 (2): 239–251. [Безкоштовна стаття PMC] [PubMed] [Google Scholar]
8. Самалі А. Вшанування професора Річарда А. Локшина з його 70-річчям. *Журнал клітинної та молекулярної медицини* . 2007 рік; 11 (6):1210–1211. [Безкоштовна стаття PMC] [PubMed] [Google Scholar]
9. Закері З., Бурш В., Тенісвуд М., Локшин Р.А. Смерть клітини: запрограмована, апоптоз, некроз чи інше? Загибель і диференціація клітин . 1995 рік; 2 (2): 87–96. [PubMed] [Google Scholar]

10. Керр Дж.Ф., Віллі А.Х., Каррі А.Р. Апоптоз: основний біологічний феномен із широким впливом на кінетику тканин. Британський журнал раку . 1972 рік; 26 (4): 239–257. [Безкоштовна стаття PMC] [PubMed] [Google Scholar]
11. Trump BF, Goldblatt PJ, Stowell RE. Електронно-мікроскопічне дослідження ранніх цитоплазматичних змін у паренхімальних клітинах печінки миші під час некрозу *in vitro* (аутоліз) Лабораторне дослідження . 1962 рік; 11 :986-1015. [PubMed] [Google Scholar]
12. Беренбом М., Чанг П.І., Бетц Х.Е., Стоуелл Р.Е. Хімічні та ферментативні зміни, пов'язані з некрозом печінки миші *in vitro*. Дослідження раку . 1955 рік; 15 (1):1–5. [PubMed] [Google Scholar]
13. Trauth BC, Klas C, Peters AMJ та ін. Регресія пухлини, опосередкована моноклональними антитілами, шляхом індукції апоптозу. Наука . 1989 рік; 245 (4915):301–305. [PubMed] [Google Scholar]
14. Юань Дж., Шахам С., Леду С., Елліс Х.М., Горвіц Х.Р. Ген смерті клітин *C. elegans* *ced-3* кодує білок, подібний до β -перетворюючого ферменту інтерлейкіну-1 ссавців. Стільниковий . 1993 рік; 75 (4):641–652. [PubMed] [Google Scholar]
15. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Медіатори апоптозу, індукованого стресом ендоплазматичного ретикулуму. Звіти EMBO . 2006 рік; 7 (9): 880–885. [Безкоштовна стаття PMC] [PubMed] [Google Scholar]
16. Ашкеназі А. Націлювання на зовнішній шлях апоптозу при раку. Огляди цитокінів і факторів росту . 2008 рік; 19 (3-4):325-331. [PubMed] [Google Scholar]
17. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. Мультимерний комплекс ARAf-1· цитохрому С є функціональною апоптосоною, яка активує прокаспазу-9. Журнал біологічної хімії . 1999 рік; 274 (17):11549–11556. [PubMed] [Google Scholar]

18. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Окремі домени Bcl-2 або сенсibiliзують, або активують мітохондріальний апоптоз, служачи прототипом терапії раку. Ракова клітина . 2002 рік; 2 (3): 183–192. [PubMed] [Google Scholar]
19. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, et al. Апоптоз ініціюється, коли ліганди Bcl-2 залучають кілька гомологів Bcl-2, а не Bax або Bak. Наука . 2007 рік; 315 (5813):856–859. [PubMed] [Google Scholar]
20. Liang XH, Jackson S, Seaman M та ін. Індукція аутофагії та інгібування пухлиногенезу бекліном 1. Природа . 1999 рік; 402 (6762):672–676. [PubMed] [Google Scholar]
21. Осумі Ю. Молекулярна дисекція аутофагії: дві убіквітиноподібні системи. Nature Reviews Молекулярна клітинна біологія . 2001; 2 (3): 211–216. [PubMed] [Google Scholar]
22. Lum JJ, Bauer DE, Kong M та ін. Регуляція фактором росту аутофагії та виживання клітин за відсутності апоптозу. Стільниковий . 2005 рік; 120 (2): 237–248. [PubMed] [Google Scholar]
23. Накаї А, Ямагучі О, Такеда Т та ін. Роль аутофагії в кардіоміоцитах у базальному стані та у відповідь на гемодинамічний стрес. Природна медицина . 2007 рік; 13 (5): 619–624. [PubMed] [Google Scholar]
24. Ульман Е, Фан Ю, Ставовчик М, Чень ХМ, Юе З, Цзун ВХ. Аутофагія сприяє некрозу в клітинах з дефіцитом апоптозу у відповідь на стрес ER. Загибель і диференціація клітин . 2008 рік; 15 (2): 422–425. [Безкоштовна стаття PMC] [PubMed] [Google Scholar]
25. Erlich S, Mizrachi L, Segev O, et al. Диференціальні взаємодії між членами сімейства Bcl-1 і Bcl-2. Аутофагія . 2007 рік; 3 (6): 561–568. [PubMed] [Google Scholar]
26. Vanlangenakker N, Berghe TV, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Молекулярні механізми та патофізіологія загибелі некротичних клітин. Сучасна молекулярна медицина . 2008 рік; 8 (3): 207–220. [PubMed] [Google Scholar]

27. Festjens N, Vanden Berghe T, Cornelis S, Vandenabeele P. RIP1, кіназа на перехресті рішення клітини жити чи померти. Загибель і диференціація клітин . 2007 рік; 14 (3):400–410. [PubMed] [Google Scholar]
28. Zhang DW, Shao J, Lin J та ін. RIP3, регулятор енергетичного метаболізму, який перемикає TNF-індуковану смерть клітин з апоптозу на некроз. Наука . 2009 рік; 325 (5938):332–336. [PubMed] [Google Scholar]
29. Самалі А, Нордгрєн Х, Животовський Б, Петерсон Е, Оррєніус С. Порівняльне дослідження апоптозу та некрозу в клітинах HepG2: інактивація каспази, викликана окислювачем, призводить до некрозу. Біохімічні та біофізичні дослідження . 1999 рік; 255 (1):6–11. [PubMed] [Google Scholar]
30. Lockshin RA, Zakeri Z. Загибель клітин у здоров'ї та хворобі. Журнал клітинної та молекулярної медицини . 2007 рік; 11 (6):1214–1224. [Безкоштовна стаття PMC] [PubMed] [Google Scholar]
31. Вєстон CR, Дєвіс RJ. Шлях передачі сигналу JNK. Сучасна думка в клітинній біології . 2007 рік; 19 (2): 142–149. [PubMed] [Google Scholar]
32. Li GC, Werb Z. Кореляція між синтезом білків теплового шоку та розвитком термотолерантності у фібробластах китайського хом'яка. Праці Національної академії наук Сполучених Штатів Америки . 1982 рік; 79 (10):3218–3222. [Безкоштовна стаття PMC] [PubMed] [Google Scholar]
33. Чжан І, Хуан Л, Чжан Дж, Москофідіс Д, Мівєчі Н.Ф. Цілеспрямоване руйнування hsf1 призводить до відсутності термотолерантності та визначає тканинно-специфічну регуляцію для індукованих стресом молекулярних шаперонів hsp. Журнал клітинної біохімії . 2002 рік; 86 (2):376–393. [PubMed] [Google Scholar]
34. Östling P, Björk JK, Roos-Mattjus P, Mezger V, Sistonen L. Фактор теплового шоку 2 (HSF2) сприяє індукованій експресії генів hsp через

- взаємодію з HSF1. Журнал біологічної хімії . 2007 рік; 282 (10):7077–7086. [PubMed] [Google Scholar]
35. Garrido C. Розмір має значення: малого HSP27 та його великих олігомерів. Загибель і диференціація клітин . 2002 рік; 9 (5):483–485. [PubMed] [Google Scholar]
36. Concannon CG, Gorman AM, Samali A. Про роль Hsp27 у регуляції апоптозу. Апоптоз . 2003 рік; 8 (1): 61–70. [PubMed] [Google Scholar]
37. Такаяма С., Бімстон Д.Н., Мацузава С.І. та ін. BAG-1 модулює шаперонну активність Hsp70/Hsc70. Журнал ЕМБО . 1997 рік; 16 (16):4887–4896. [Безкоштовна стаття РМС] [PubMed] [Google Scholar]
38. Шредер М, Кауфман Р.Я. У ссавців розгорнута білкова відповідь. Річний огляд біохімії . 2005 рік; 74 :739–789. [PubMed] [Google Scholar]
39. Cullinan SB, Diehl JA. PERK-залежна активація Nrf2 сприяє окисно-відновному гомеостазу та виживанню клітин після стресу ендоплазматичного ретикулуму. Журнал біологічної хімії . 2004; 279 (19):20108–20117. [PubMed] [Google Scholar]
40. Накагава Т., Чжу Х., Морісіма Н. та ін. Каспаза-12 опосередковує специфічний для ендоплазматичного ретикулуму апоптоз і цитотоксичність амілоїду- β . природа _ 2000; 403 (6765):98–103. [PubMed] [Google Scholar]
41. Urano F, Wang X, Bertolotti A та ін. Зв'язок стресу в ER з активацією протеїнкіназ JNK трансмембранною протеїнкіназою IRE1. Наука . 2000; 287 (5453):664–666. [PubMed] [Google Scholar]
42. Tamatani M, Matsuyama T, Yamaguchi A та ін. ORP150 захищає від смерті нейронів, спричиненої гіпоксією/ішемією. Природна медицина . 2001; 7 (3): 317–323. [PubMed] [Google Scholar]
43. Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T та ін. ORP150/HSP12A регулює виживання клітин Пуркін'є: роль стресу ендоплазматичного

- ретикулуму в розвитку мозочка. Журнал нейронаук . 2004; 24 (6):1486–1496. [Безкоштовна стаття PMC] [PubMed] [Google Scholar]
44. Кудо Т., Канемото С., Хара Х та ін. Молекулярний індуктор шаперону захищає нейрони від стресу ER. Загибель і диференціація клітин . 2008 рік; 15 (2): 364–375. [PubMed] [Google Scholar]
45. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NR-D, Huang P. Redox регуляція виживання клітин. Антиоксиданти та окисно-відновна сигналізація . 2008 рік; 10 (8):1343–1374. [Безкоштовна стаття PMC] [PubMed] [Google Scholar]
46. Сапоне А, Аффатато А, Каністро Д та ін. Індукція та пригнічення ізоферментів цитохрому P450 та генерація кисневих радикалів процимідоном у печінці, нирках та легенях мишей CD1. Дослідження мутацій . 2003 рік; 527 (1-2):67-80. [PubMed] [Google Scholar]
47. Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Супероксид є основною активною формою кисню, що регулює аутофагію. Загибель і диференціація клітин . 2009 рік; 16 (7):1040–1052. [PubMed] [Google Scholar]
48. Bosca L, Hortelano S. Механізми залежного від оксиду азоту апоптозу: залучення мітохондріальних медіаторів. Стільникова сигналізація . 1999 рік; 11 (4): 239–244. [PubMed] [Google Scholar]
49. Сах Н.К., Танеджа Т.К., Патак Н., Бегум Р., Атар М., Хаснайн С.Є. Бакуловірусний антиапоптотичний ген p35 також функціонує через оксидант-залежний шлях. Праці Національної академії наук Сполучених Штатів Америки . 1999 рік; 96 (9):4838–4843. [Безкоштовна стаття PMC] [PubMed] [Google Scholar]
50. Frontiersin [Електронний ресурс]. – Режим доступу:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00928/full>
51. Санчес Е. Л., Лагунов М. Вірусна активація клітинного метаболізму. Вірусологія. 2015;479–480:609–18. pmid: 25812764
52. Уолш Е.Є. Респіраторно-синцитіальна вірусна інфекція: хвороба для будь-якого віку. Clin Chest Med. 2017;38(1):29–36. pmid: 28159159

53. Hillyer P, Shepard R, Uehling M, Krenz M, Sheikh F, Thayer KR та ін. Диференціальні відповіді клітинних ліній респіраторного епітелію людини на респіраторно-синцитіальний вірус відображають різні схеми контролю інфекції. *J Virol.* 2018;92(15).
54. Мартін-Вісенте М., Гонсалес-Ріаньо С., Барбас С., Хіменес-Соуса М., Брочадо-Кіт О., Ресіно С. та ін. (2020) Метаболічні зміни під час інфікування епітеліальних клітин респіраторно-синцитіальним вірусом. *PLoS ONE* 15(3): e0230844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230844>
55. Edinger AL, Thompson CB. Akt підтримує розмір і виживання клітин за рахунок збільшення залежного від mTOR поглинання поживних речовин. *Mol Biol Cell.* 2002 рік; 13 :2276–2288.
56. ДеБерардініс RJ, Лум JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. Біологія раку: метаболічне перепрограмування сприяє росту та проліферації клітин. *клітинний метаб.* 2008 рік; 7 :11–20. [PubMed] [Google Scholar]
57. Calle EE, Kaaks R. Надмірна вага, ожиріння та рак: епідеміологічні дані та запропоновані механізми. *Nat Rev Рак.* 2004; 4 :579–591.
58. NCBI [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23913635/>
59. Каллман Ф., Вільямс Р.К., Дульбекко Р., Фогт М. Тонка структура змін, що відбуваються в культивованих клітинах, відібраних через певні інтервали протягом одного циклу росту вірусу поліомієліту. *J. Viophys. біохім. Цитол.* 1958 рік; 4 :301–308. doi: 10.1083/jcb.4.3.301.
60. Bienz K., Egger D., Pasamontes L. Асоціація поліовірусних білків геномної області Р2 з комплексом реплікації вірусу та індукованим вірусом синтезом мембрани, як візуалізовано за допомогою електронно-мікроскопічної імуноцитохімії та авторадіографії. *Вірусологія.* 1987 рік; 160 :220–226.
61. Dales S., Eggers HJ, Tamm I. Електронно-мікроскопічне дослідження утворення поліовірусу. *Вірусологія.* 1965 рік; 26 :379–389.

- 62.Бєлов Г.А., Наїр В., Хансен Б.Т., Хойт Ф.Х., Фішер Е.Р., Еренфельд Е.
Комплексний динамічний розвиток поліовірусних мембранних комплексів реплікації. Ж. Вірол. 2012 рік; 86 :302–312.
- 63.Schlegel A., Giddings TH, Ladinsky MS, Kirkegaard K. Клітинне походження та ультраструктура мембран, індукованих під час поліовірусної інфекції. Ж. Вірол. 1996 рік; 70 :6576–6588.
[Безкоштовна стаття РМС]
- 64.С. А. Александров, Х. М. Субхаш, А. Зам і М. Ліхі, «Наночутлива оптична когерентна томографія», Нанорозмір 6 (7), 3545–3549 (2014).
- 65.V. Raghavan, C. O'Flatharta, R. Dwyer, A. Breathnach, H. Zafar, P. Dockery, A. Wheatley, I. Keogh, M. Leahy та M. Olivo, “Подвійні плазмонні золоті нанозірки для фотоакустики візуалізація та фототермічна терапія», *Nanomedicine* 12(5), 457–471 (2017).
- 66.М. Домінічі, К. Ле Блан, І. Мюллер, І. Слейпер-Кортенбах, Ф. Маріні, Д. Краузе, Р. Дінс, А. Кітінг, Д. Прокоп та Е. Горвіц, «Мінімальні критерії для визначення мультипотентних мезенхімальні стромальні клітини. Позиція Міжнародного товариства клітинної терапії», *Cytotherapy* 8(4), 315–317 (2006).
- 67.Дж. М. Мерфі, К. Діксон, С. Бек, Д. Фабіан, А. Фельдман і Ф. Баррі, «Знижена хондрогенна та адипогенна активність мезенхімальних стовбурових клітин у пацієнтів із прогресуючим остеоартритом», *Arthritis Rheum.* 46, 704–713 (2002).
- 68.Lennicke С. Окисно-відновна протеоміка: методи ідентифікації та збагачення редокс-модифікованих білків та їх застосування. *Протеоміка.* 2016 рік; 16 (2): 197–213.
- 69.Бехер І. Поширена зміна термічної стабільності білка протягом клітинного циклу. *Стільниковий.* 2018 рік; 173 (6):1495–1507. e18.
- 70.Дай Л. Модуляція станів взаємодії білка через клітинний цикл. *Стільниковий.* 2018 рік; 173 (6):1481–1494. e13. [PubMed]

71. Дай Л. Горизонтальна клітинна біологія: моніторинг глобальних змін станів взаємодії білка за допомогою аналізу протеомного клітинного теплового зсуву (CETSA) *Annu. Rev. Biochem.* 2019 У пресі. [PubMed]
72. Мандей округ Колумбія, Хіскокс Дж.А., Барр Дж.Н. Кількісний протеомний аналіз клітин A549, інфікованих респіраторно-синцитіальним вірусом людини підгрупи В, з використанням SILAC у поєднанні з РХ-МС/МС. *Протеоміка.* 2010;10(23):4320–34.
73. Tian B, Zhang Y, Luxon BA, Garofalo RP, Casola A, Sinha M та ін. Ідентифікація NF-каппаВ-залежних генних мереж у клітинах, інфікованих респіраторно-синцитіальним вірусом. *J Virol.* 2002;76(13):6800–14.
74. NCBI [Електронний ресурс]. – Режим доступу:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3190402/>
75. Берд С.В., Мейнард Н.Д., Коверт М.В., Кіркегор К. Нелітичне поширення вірусу, посилене компонентами аутофагії. *Proc. Natl. акад. Sci. США.* 2014 рік; 111 :13081–13086. doi: 10.1073/pnas.1401437111.
[Безкоштовна стаття PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
76. Egger D., Bienz K. Внутрішньоклітинне розташування та транслокація тихих і активних комплексів реплікації поліовірусу. *Дж. Ген. Вірол.* 2005 рік; 86 :707–718. doi: 10.1099/vir.0.80442-0. [PubMed]
77. NCBI [Електронний ресурс]. – Режим доступу:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632382/>
78. KW Kavalkovich, RE Boynton, J. Mary Murphy та F. Barry, «Хондрогенна диференціація мезенхімальних стовбурових клітин людини в системі культури альгінатного шару», *In Vitro Cell Dev. Biol.* Анім. 38(8), 457–466 (2002).
79. JC Marín-Llera, D. Garcíadiego-Cázares, and J. Chimal-Monroy, «Розуміння клітинних і молекулярних механізмів, які контролюють ранні рішення щодо долі клітин під час апендикулярного скелетогенезу», *Front. Жене.* 10, 1 (2019).

80.[Електронний ресурс]. – Режим доступу:

<https://opg.optica.org/boe/fulltext.cfm?uri=boe-14-4-1411&id=527184#articleReferences>

81.NCBI Моніторинг структурної модуляції редокс-чутливих білків у клітинах за допомогою MS-CETSA [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6439307/>