

**ВЗАИМОСВЯЗЬ АКТИВНОСТИ КАСПАЗЫ-3, РЕГУЛЯТОРОВ АПОПТОЗА
И АУТОФАГИИ У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ МОЛОДЫХ ЛИЦ ПОД ВЛИЯНИЕМ
НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ЧАСТОТОЙ 1 ГГц**

С.С. БОНДАРЬ, И.В. ТЕРЕХОВ

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, пр-т Ленина, 92, Тула, 300012, Россия

Аннотация. В исследовании обсуждается взаимосвязь активности каспазы-3 и молекулярных регуляторов дифференцировки и запрограммированной гибели и аутофагии мононуклеарных клеток цельной крови при воздействии на них низкоинтенсивного микроволнового излучения частотой 1 ГГц. Методом иммуноферментного анализа в МНК исследована активность каспазы-3, содержание протеинов *DAXX*, *RASSF5*, *RNF125*, *HIPK2*, *MDM2*, *ASK1*, и *ATG12*. Исследование влияния регуляторных протеинов на активность каспазы-3 проведено методом линейного регрессионного анализа.

Результаты исследования. В ходе исследования установлено, что активность каспазы-3 находится в прямой зависимости от уровня в МНК протеина *ASK1* и *MDM2* и отрицательной от уровня белка *DAXX*. При этом так же выявлено значимое влияние на активность каспазы-3 протеинов *DAXX*, *RASSF5*, *RNF125*, *ATG12* и антиоксидантов. Установлено, что наиболее сильное положительное влияние на активность каспазы-3 оказывает протеин *MDM2*, тогда как отрицательное – *RASSF5*. Вместе с тем, по результатам проведенного исследования было установлено, что протеинкиназа *HIPK2* не оказывает статистически значимого влияния на активность каспазы-3. Низкоинтенсивное микроволновое излучение частотой 1 ГГц ассоциировано со снижением активности каспазы-3, на фоне повышения в МНК уровня *DAXX*, *RASSF5*, *RNF125*, *HIPK2*, *MDM2*, *ASK1*, и *ATG12*, из которых уровень *ATG12* повышался наиболее существенно, тогда как содержание *MDM2* и *ASK1* изменялось в наименьшей степени.

Закключение. Низкоинтенсивное облучение МНК микроволнами частотой 1 ГГц, в целом, ассоциировано с торможением активности каспазы-3, что позволяет предполагать ограничение процессов апоптоза, стимуляцию выживания МНК, а также ускорение обновления клеточных структур, за счет повышения в клетках протеина *ATG12*. Результаты свидетельствуют о возможной антионкогенной активности микроволн частотой 1 ГГц, объясняя ранее выявленные эффекты торможения роста и регресс злокачественных новообразований под влиянием микроволн.

Ключевые слова: *RASSF5*, *ATG12*, *DAXX*, *RNF125*, каспаза-3, мононуклеарные клетки цельной крови, микроволны.

**INTERRELATION OF CASPASE-3 ACTIVITY, APOPTOSIS REGULATORS AND AUTOPHAGIA
IN PRACTICALLY HEALTHY YOUNG PEOPLES UNDER THE INFLUENCE OF LOW-INTENSIVE
RADIATION OF FREQUENCY 1 GHz**

I.V. TEREKHOV, S.S. BONDAR

Tula State University, Lenin Av., 92, Tula, 300012, Russia

Abstract. The study discusses the relationship between the activity of caspase - 3 and molecular regulators of differentiation and programmed death and autophagia of mononuclear cells of whole blood at the exposure of low-intensity microwave radiation at frequency of 1 GHz. By enzyme immunoassay in MNCs the authors investigated caspase-3 activity, the protein *DAXX*, *RASSF5*, *RNF125*, *HIPK2*, *MDM2*, *ASK1*, and *ATG12*. A study of the effect of regulatory proteins on caspase-3 activity was carried out by linear regression analysis.

Result. The study found that the activity of caspase - 3 is directly dependent on the level of protein *ASK1* and *MDM2* and negative on the level of *DAXX*. At the same time, it was found a significant effect on the activity of caspase-3 protein *DAXX*, *RASSF5*, *RNF125*, *ATG12* and antioxidants. The authors revealed that the strongest positive effect on the activity of caspase-3 renders the protein *MDM2*, whereas a negative – *RASSF5*. At the same time, according to the results of the study, it was found that the protein kinase *HIPK2* does not have a statistically significant effect on the activity of caspase-3. Low-intensity microwave radiation with a frequency of 1 GHz is associated with a decrease in activity of caspase-3, against the background of an increase in the level of *DAXX*, *RASSF5*, *RNF125*, *HIPK2*, *MDM2*, *ASK1*, and *ATG12*, of which the level of *ATG12* increased most significantly, whereas the content of *MDM2* and *ASK1* changed to the smallest extent.

Conclusion. Low-intensity irradiation MNC microwave frequency of 1 GHz generally associated with the inhibition of caspase-3, suggesting that the limitation of apoptosis, stimulation of MNC survival and acceleration

of updates of cellular structures, due to the increase in cell protein ATG12. The results indicate possible antioncogenic activity of microwaves with a frequency of 1 GHz, explaining the previously identified effects of growth inhibition and regression of malignant tumors under the influence of microwaves.

Key words: ATG12, DAXX, RASSF5, RNF125, caspase-3, MNCs, microwaves.

Реактивность иммунокомпетентных клеток, обеспечивающих ответ на разнообразные внешние раздражители, в значительной мере определяется состоянием внутриклеточных молекулярных механизмов, из которых *JAK/STAT/SOCS*-сигнальный путь наиболее важен для обеспечения клеточной реактивности в ответ на информационные сигналы – цитокины и факторы роста. Обеспечивая активацию программ саногенеза, *JAK/STAT/SOCS*-сигнальный путь играет ключевую роль в развитии и поддержании адаптивного иммунного ответа [1, 2, 10].

В регуляции программ воспаления, апоптоза и аутофагии ключевую роль играет протеин *p53*, функциональное состояние которого определяется характером посттрансляционной модификации [3]. Повышение устойчивости белка *p53* к деградации, за счет стабилизации его структуры при взаимодействии с протеинами *OTUD5* и *HIPK2*, является одним из механизмов поддержания баланса пролиферации и клеточной гибели [3, 4]. В настоящее время установлено, что в регуляции макроаутофагии, ключевая роль отводится белкам семейства *ATG*, в частности, *ATG12* и *ATG5*, продукция которых находится под контролем *MAPK/SAPK*-сигнального пути [5]. При этом, как известно, в процессе апоптоза ключевую роль играют каспазы, активация которых так же может быть инициирована через *MAPK/SAPK*-сигнальный путь, путем посттрансляционной модификации протеина *p53* [6].

Показано, что в физиологических условиях *MAPK/SAPK*-сигнальный путь принимает непосредственное участие в регуляции активности процессов клеточной пролиферации, аутофагии и апоптоза в ответ на управляющие сигналы цитокинов и митогенов, в первую очередь за счет модуляции активности протеина *p53* [11, 12]. Результаты исследований свидетельствуют о том, что указанные процессы контролируются негативными регуляторами, в том числе фосфатазой *PP2CA* [8].

Таким образом, в иммунокомпетентных клетках *JAK/STAT/SOCS* и *MAPK/SAPK*-сигнальный путь являясь регуляторами реактивности в отношении внешних сигналов, осуществляют совместный контроль ключевых внутриклеточных процессов [9, 10]. При этом негативные регуляторы сигнальных путей, возможно, обладают модулирующим влиянием на физиологические процессы в клетках, в том числе их пролиферативную и метаболическую активность. Вместе с тем, не смотря на многочисленные публикации, в настоящее время взаимосвязи между негативными регуляторами *MAPK/SAPK*-сигнального пути и *JAK/STAT*, а также роль супрессоров цитокиновой сигнализации в модуляции процессов пролиферации и клеточной гибели изучены недостаточно полно, в связи с чем, целью настоящего исследования явилось изучение корреляции содержания в мононуклеарных клетках цельной крови практически здоровых лиц протеинов *ATG12*, *HIPK2*, *PP2CA*, активности каспазы-3, фосфорилирования белка *p53*, протеинкиназ *p38* и *ERK* в зависимости от уровня супрессора цитокиновой сигнализации *SOCs4* [7-9].

Материалы и методы исследования. В соответствии с целью настоящей работы были обследованы 30 практически здоровых молодых лиц мужского пола из числа доноров крови в возрасте от 20 до 33 лет.

Материалом для исследования служила венозная кровь, забиравшаяся в утренние часы (с 7:00 до 7:30) из локтевой вены. Для проведения исследования внутриклеточных маркеров 1 мл цельной крови вносили во флакон, содержащий 4 мл среды *DMEM*, гепарин (2,5 ЕД/мл), гентамицин (100 мкг/мл) и *L*-глутамин (0,6 мг/мл). Подготовленные таким образом образцы облучали в течение 45 минут аппаратом микроволновой терапии «Акватор-02» (ООО «ТЕЛЕМАК», г. Саратов), на частоте $1,0 \pm 0,03$ ГГц (плотность потока энергии 50 нВт/см^2) [11].

После облучения флаконы помещались на 24 часа в термостат при 37°C , после чего на градиенте фиколл-верографина ($\rho=1,077$) выделяли МНК с приготовлением лизатов, для чего использовали 1 мл клеточной суспензии содержащей 5×10^6 МНК. Выделенные клетки дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере, после чего лизировали, используя буфер следующего состава: 10 mM *Tris*, pH 7,4; 100 mM *NaCl*, 1 mM *EDTA*, 1 mM *EGTA*, 1 mM *NaF*, 20 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 2 mM Na_3VO_4 , 1% *Triton X-100*, 10 % глицерола, 0,1 % *SDS*, 0,5% деоксихолата, 1 mM *PMSF* (матричный 0,3 M раствор в *DMSO*). В лизирующий раствор добавляли (*ex tempore*) 1 % коктейля ингибитора протеаз (*Sigma-Aldrich*, США), выдерживали на льду (при $t = +4-5^\circ\text{C}$) в течение 15 минут. Ядерно-цитоплазматические лизаты центрифугировали в течение 10 минут при 15 000 об/мин, с последующим аликвотированием и замораживанием при -76°C . Подсчет клеток и анализ жизнеспособности осуществляли с помощью счетчика *TC20* (*Bio-Rad*, США). Жизнеспособность клеток подготовленных культур составляла не менее 90%.

Облучение образцов крови проводили с использованием генератора сигналов *HP8664A* с использованием излучающей антенны магнитного типа в дальней зоне облучателя, непосредственно перед их помещением в термостат [12, 13].

В лизатах МНК методом иммуноферментного анализа (ИФА) оценивали содержание протеинов *ATG12*, *RNF125*, *RASSF5*, *MDM2*, *DAXX*, протеинкиназ *HIPK2* и *ASK1*, уровень активной формы каспазы-3 (*K-3*). В межклеточной жидкости оценивали общее содержание (концентрацию) *антиоксидантов* (*АОХ*). При проведении ИФА использовали наборы реактивов *Cusabio Biotech* (КНР). Исследование концентрации указанных факторов проводили на автоматическом ИФА анализаторе *Personal LAB (Adaltis Italia S.p.A., Италия)*.

Статистическую обработку проводили в программе *Statistica 7.0*. Результаты исследования представлены в виде: среднее значение признака (x), выборочного среднеквадратичного отклонения (s), медианы (Me), 25 и 75 перцентили выборки (25; 75 %). Статистическую значимость (p) межгрупповых различий в несвязанных выборках оценивали с помощью *U*-критерия Манна-Уитни, в связанных – с использованием *T*-критерия Уилкоксона. Взаимосвязь исследованных показателей оценивали методом линейного корреляционного анализа, влияние исследованных молекул на активность каспазы-3 оценивали методом множественного регрессионного анализа с пошаговым включением переменных в модель.

Результаты и их обсуждение. Результаты оценки содержания исследованных факторов у практически здоровых лиц, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Уровень исследованных факторов

Фактор	Показатели			
	x	25%	Me	75%
<i>АОХ</i> , ммоль/л	1,48	1,43	1,47	1,54
<i>K-3</i> , ед/нг	1,11	0,74	0,87	1,61
<i>ATG12</i> , нг/мл	0,136	0,118	0,128	0,162
<i>RNF125</i> , нг/мл	0,694	0,58	0,76	0,875
<i>RASSF5</i> , нг/мл	0,666	0,51	0,65	0,795
<i>HIPK2</i> , нг/мл	0,672	0,53	0,73	0,78
<i>DAXX</i> , нг/мл	0,565	0,375	0,59	0,75
<i>ASK1</i> , нг/мл	0,577	0,507	0,591	0,704
<i>MDM2</i> , нг/мл	0,427	0,25	0,421	0,6

Результаты линейного корреляционного анализа представлены в табл. 2.

Таблица 2

Корреляции исследованных факторов

	<i>АОС</i>	<i>K-3</i>	<i>ATG12</i>	<i>RNF125</i>	<i>RASSF5</i>	<i>HIPK2</i>	<i>DAXX</i>	<i>ASK1</i>	<i>MDM2</i>
<i>АОС</i>	-	-0,15	0,49	0,33	-0,7	0,44	0,58	0,05	0,07
<i>K-3</i>	-0,15	-	0,12	-0,14	0,18	-0,08	-0,54	0,39	0,6
<i>ATG12</i>	0,49	0,12	-	0,07	-0,2	0,21	0,2	0,16	0,05
<i>RNF125</i>	0,33	-0,14	0,07	-	-0,39	0,3	0,16	0,17	-0,03
<i>RASSF5</i>	-0,7	0,18	-0,2	-0,39	-	-0,6	-0,76	-0,43	0,31
<i>HIPK2</i>	0,44	-0,08	0,21	0,3	-0,6	-	0,32	0,48	-0,3
<i>DAXX</i>	0,58	-0,54	0,2	0,16	-0,76	0,32	-	0,16	-0,28
<i>ASK1</i>	0,05	0,39	0,16	0,17	-0,43	0,48	0,16	-	-0,05
<i>MDM2</i>	0,07	0,6	0,05	-0,03	0,31	-0,3	-0,28	-0,05	-

Примечание: жирным шрифтом отмечены коэффициенты корреляции с уровнем значимости менее 0,05

Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о сильной отрицательной взаимосвязи содержания в МНК протеинов *RASSF5* и *DAXX*, а также концентрации антиоксидантов. Умеренная положительная взаимосвязь отмечалась между содержанием в МНК белка *MDM2* и активностью каспазы-3. Так же умеренная положительная корреляция имела место между концентрацией антиоксидантов и уровнем белка *DAXX*, уровнем антиоксидантов и убиквитин-лигазы *RNF125*. Уровень белка *ATG12* так же отличался умеренной положительной взаимосвязью с концентрацией антиоксидантов.

Умеренная отрицательная взаимосвязь имела место между протеинкиназой *HIPK2* и *MDM2*, отражая характер модулирующей активности *HIPK2* в отношении *p53*-зависимых механизмов апоптоза. При

этом положительно коррелируя с уровнем антиоксидантов, содержанием в МНК протеинов *RNF125*, *DAXX* и *ASK1*, и отрицательно с уровнем *RASSF5*, протеинкиназа *HIPK2* выступает в роли интегрального регулятора p53-независимых механизмов контроля апоптоза.

Проведенный анализ так же показал, что уровень проапоптотической протеинкиназы *ASK1* находится в умеренной положительной взаимосвязи с активностью каспазы-3 и содержанием в МНК протеинкиназы *HIPK2*, отрицательно коррелируя при этом с уровнем *RASSF5*.

С целью исследования взаимосвязи активности каспазы-3 с уровнем молекулярных регуляторов внутриклеточных сигнальных путей, проведен множественный линейный регрессионный анализ с пошаговым включением переменных в модуль, результаты которого представлены табл. 3.

Таблица 3

Результаты многофакторного линейного регрессионного анализа

Факторы	<i>Beta</i>	<i>m_{Beta}</i>	<i>B</i>	<i>m_B</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
Свободный член	-	-	5,83	1,17	5,0	0,00003
<i>MDM2</i>	0,66	0,073	1,64	0,181	9,1	0,0000001
<i>ASK1</i>	0,19	0,085	0,58	0,256	2,3	0,03
<i>DAXX</i>	-0,93	0,098	-2,32	0,244	-9,5	0,0000001
<i>RASSF5</i>	-0,99	0,163	-2,4	0,396	-6,1	0,000002
<i>RNF125</i>	-0,29	0,066	-0,63	0,142	-4,4	0,0001
<i>ATG12</i>	0,25	0,076	2,35	0,72	3,3	0,003
<i>AOX</i>	-0,38	0,127	-1,85	0,621	-3,0	0,006

Примечание: *Beta* – стандартизированные коэффициенты регрессионного уравнения, *B* – коэффициенты регрессионного уравнения, *m_B*, *m_{Beta}* – стандартная ошибка оценки коэффициентов регрессии, *t* – значение критерия Стьюдента соответствующего регрессионного коэффициента, *p* – уровень значимости оценки коэффициента регрессии, свободный член – свободный член (коэффициент) регрессионного уравнения

Результаты проведенного анализа свидетельствуют о том, что уровень протеинкиназы *HIPK2* не является фактором, значимо влияющим на активность каспазы-3, в связи с чем, данный фактор не включен в регрессионную модель.

Анализ стандартизированных коэффициентов регрессии, характеризующих вклад соответствующего предиктора в вариабельность зависимой переменной, показал, что наиболее значимыми факторами, влияющими на активность каспазы-3, являются протеины *RASSF5*, *DAXX* и *MDM2*. При этом первые два предиктора, вошедших в регрессионное уравнение, отличаются отрицательным влиянием на ее активность, в то время как *MDM2* – положительным. Положительно влияют на активность каспазы-3 так же уровень протеинкиназы *ASK1* и протеина *ATG12*, отрицательно – *RNF125* и уровень антиоксидантов.

Результаты регрессионного анализа показали, что коэффициент линейной корреляции (*R*) математической модели исследуемой зависимости составил 0,953, коэффициент детерминации (*R*²)=0,91, исправленный коэффициент детерминации *R*²=0,884 (значение F-критерия – 38,0; стандартная ошибка оценки (*m*) – 0,16; *p*<0,0001). Таким образом, полученная регрессионная модель, характеризующаяся высокой статистической значимостью, объясняет 88,4% наблюдаемой в настоящем исследовании изменчивости активности каспазы-3 в МНК периферической крови.

Проведенный анализ свидетельствует о низкой корреляции остатков, указывая на удовлетворительное качество модели (значение статистики Дарбина-Уотсона – 2,4; коэффициент корреляции остатков = – 0,22). Результаты графического анализа остатков, т.е. разности между предсказанным моделью и измеренным значением активности каспазы-3 свидетельствуя о распределении близком к нормальному, так же указывают на ее удовлетворительное качество (рис. 1).

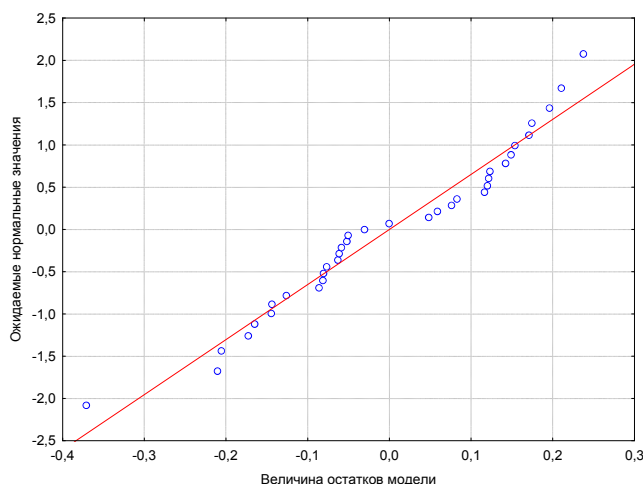


Рис .1. Распределение остатков регрессионной модели

Значения частных и получастных корреляций представлены в табл. 4.

Таблица 4

Значения частных корреляций исследованных предикторов и активности каспазы-3

Предиктор	Частная корреляция (r)	Получастная корреляция (r)
<i>MDM2</i>	0,87	0,53
<i>ASK1</i>	0,4	0,13
<i>DAXX</i>	-0,88	-0,55
<i>RASSF5</i>	-0,76	-0,35
<i>RNF125</i>	-0,65	-0,26
<i>ATG12</i>	0,53	0,19
<i>AOX</i>	-0,5	-0,17

Анализ частных и получастных корреляций, отражающих индивидуальное влияние исследуемых факторов на активность каспазы-3, при условии фиксированного влияния остальных факторов, свидетельствует о сильной взаимосвязи *MDM2*, *DAXX*, *RASSF5*, *RNF125* и активности каспазы-3. При этом влияние остальных факторов на активность каспазы-3 носит умеренный характер.

Таким образом, по результатам проеденного исследования, связь активности каспазы-3 и уровня исследованных показателей, выглядит следующим образом: активность каспазы-3 (ед/нг) = $5,83 + 1,64xMDM2 + 0,58xASK1 + 2,35xATG12 - 2,32xDAXX - 2,4xRASSF5 - 0,63xRNF125 - 1,85xAOX$.

Влияние резонансных микроволн частотой 1 ГГц на уровень исследованных показателей, представлено на рис. 2.

Проведенный анализ эффектов низкоинтенсивных микроволн частотой 1 ГГц свидетельствует о минимальной чувствительности содержания в МНК протеинкиназы *ASK1* и протеина *MDM2* к их воздействию. Наиболее чувствительным к микроволнам является содержание в клетке белка *ATG12*, участвующего в регуляции процесса аутофагии, принимающего участие в образовании аутофагосомы, разрушении поврежденных внутриклеточных органелл и стареющих белковых комплексов, способствующего активации каспазы-3. Кроме этого, микроволны способствуют повышению содержания протеина *DAXX*, обладающего, как было установлено выше, отрицательным влиянием на активность каспазы-3, а также концентрации антиоксидантов, также способствующих ограничению ее активности. Проведенный анализ свидетельствует о положительном влиянии микроволн на уровень *E3*-убиквитин лигазы *RNF125*, а также *Ras*-ассоциированного протеина *RASSF5*. Кроме того отмечено положительное влияние излучения на содержание протеинкиназы *HIPK2*. В то же время уровень проапоптотических факторов *MDM2* и *ASK1* после облучения возрастал в минимальном размере в сравнении с другими исследованными молекулами.

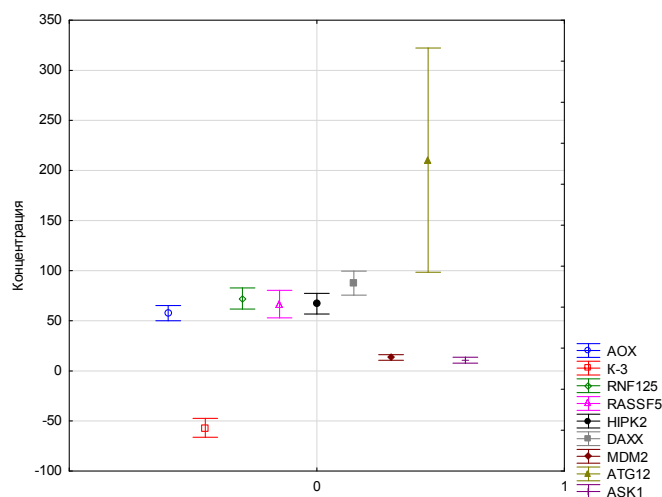


Рис. 2. Влияние облучения на уровень исследованных факторов

Примечание: символом \square отмечены максимальное значение эффекта облучения. Эффекты облучения (различия между облученными и необлученными культурами), представлены в абсолютных величинах (%)

Результаты и их обсуждение. В настоящее время показано, что устойчивое течение физиологических процессов в организме определяется, в том числе балансом про- и антиапоптотических стимулов. При этом баланс соответствующих клеточных реакций определяет нормальное течение таких процессов как репарация и регенерация тканей и органов, играя так же определенную роль в процессе старения. Нормальная активность данных процессов также необходима для регуляции клеточного состава тканей, своевременного прекращения жизненного цикла трансформированных клеток и предупреждения развития опухолей [14].

Результаты проведенного исследования свидетельствуют что в регуляции апоптоза МНК у практических здоровых лиц принимают участие различные белки, обладающие онкосупрессивными свойствами, в числе которых *RASSF5* (*NORE1A*) и *RNF125*. Кроме этого в исследовании выявлено отрицательное влияние протеина *DAXX* на активность каспазы-3, что позволяет говорить о его участие в процессах апоптоза в качестве негативного регулятора, тогда как в большинстве своем, данный протеин отличается противоположным влиянием на изучаемый процесс [15-17]. Возможным механизмом такого влияния является подавлением активности протеина *p53* при его взаимодействии с *DAXX* [19]. Результаты проведенного исследования показали, что активность каспазы-3 взаимосвязана с антиоксидантным статусом, определяющимся концентрацией в клеточном окружении антиоксидантов. При этом очевидно, что подавление процессов ПОЛ и снижение уровня активных форм кислорода в клетках, ограничивает активность *MAPK/SAPK*-сигнального пути, препятствуя активации терминальной протеинкиназы *JNK*, тем самым предупреждая фосфорилирование протеинкиназы *ASK1*, что, в свою очередь, тормозит апоптоз. Очевидно, что в данном случае важна роль *Keap1-Nrf2-ARE*-сигнального пути [20].

Проведенный анализ показал, что протеины *MDM2*, *ASK1*, *ATG12* могут рассматриваться в качестве положительных регуляторов апоптоза, определяющих повышение активности каспазы-3 в МНК. Таким образом, полученные в настоящем исследовании результаты позволяют говорить о многофакторном контроле активности апоптоза у практически здоровых лиц, осуществляющемся, очевидно, за счет посттранскрипционной модификации структуры ключевого регулятора данного процесса – протеина *p53*, а также модуляции активности редокс-чувствительных внутриклеточных сигнальных путей [20, 21]. Антиоксидантный статус, а также содержание в МНК молекул, обеспечивающих регуляцию функции белка *p53* могут рассматриваться в качестве терапевтических мишеней в аспекте осуществления коррекции дисрегуляторных нарушений при воздействии на клетки цитотоксических агентов, например активных форм кислорода и токсинов, сопровождающихся активацией апоптоза [22].

Стимулируя повышение содержания в МНК практически здоровых лиц протеинов *DAXX*, *RASSF5*, *RNF125* и антиоксидантов, низкоинтенсивные микроволны частотой 1 ГГц, в целом, способствуют снижению уровня каспазы-3, а, следовательно, ограничению апоптоза и стимуляции регенеративных и пролиферативных процессов. Вместе с тем, повышающееся на этом фоне содержание в МНК протеинов *MDM2*, *ASK1* и *ATG12*, определяет сбалансированность формирующегося биологического эффекта, достигающуюся за счет активации механизмов контроля пролиферативной активности облученных клеток, предупреждающих вступление клетки в *G1*-фазу клеточного цикла без получения соответствующих

внешних управляющих сигналов, например, от гормонов, факторов роста и интерлейкинов [7, 23, 24]. При этом повышение содержания протеинов, запускающих процессы апоптоза и аутофагии, в случае если клетка утратила или ослабила чувствительность к внешним управляющим клеточным циклом сигналам, будет способствовать остановке клеточного цикла в одной из сверхточных точек, либо инициации апоптоза. Реализация данного механизма, очевидно, обеспечивает реализацию биологических эффектов микроволн, выявленных в результате ранее проведенных исследований [25-27].

Проведенный анализ показал, что снижение активности каспазы-3 у практически здоровых лиц под воздействием низкоинтенсивных резонансных микроволн частотой 1 ГГц в большей мере обусловлено повышением содержания в МНК протеина *DAXX*, тогда как увеличение активности каспазы-3 определяется содержанием *MDM2*, что позволяет рассматривать низкоинтенсивное микроволновое излучение частотой 1 ГГц в качестве возможного физиотерапевтического фактора, способного проявлять антионкогенную активность. Очевидно, что данные процессы могут формироваться путем модуляции активности протеина *p53*, проапоптотическая функция которого стимулируется белком *MDM2*, стабилизирующего структуру, предупреждая его разрушение, тогда как убиквитинирование с последующим протеосомной деградацией данных факторов, а также протеинкиназы *HIPK* под влиянием убиквитин-лигазы *RNF125*, в свою очередь, будет способствовать подавлению активности каспазы-3 [28, 29].

Таким образом, результаты проведенного анализа указывают на то, что микроволны частотой 1 ГГц, в целом, способствуют торможению активации каспазы-3 и ограничению процессов апоптоза, тем самым стимулируя выживание иммунокомпетентных клеток [30]. В то же время, микроволны способствуют ускорению обновления клеточных структур, за счет стимуляции процессов аутофагии, повышая в клетках содержание одного из регуляторов данного механизма – протеина *ATG12*.

Выводы:

1. Активность каспазы-3 находится в прямой зависимости от уровня в МНК протеина *ASK1* и *MDM2* и отрицательной от уровня белка *DAXX*. При этом выявлено значимое влияние на активность каспазы-3 протеинов *MDM2*, *ASK1*, *DAXX*, *RASSF5*, *RNF125*, *ATG12*, а так же концентрации антиоксидантов. При этом наиболее сильное положительное влияние на активность каспазы-3 оказывает протеин *MDM2*, тогда как отрицательное – *RASSF5*. Вместе с тем, по результатам проведенного исследования было установлено, что протеинкиназа *HIPK2* не оказывает влияния на активность каспазы-3.

2. Низкоинтенсивное микроволновое излучение частотой 1 ГГц сопровождается снижением активности каспазы-3, на фоне повышения в МНК содержания *DAXX*, *RASSF5*, *RNF125*, *HIPK2*, *MDM2*, *ASK1*, и *ATG12*, из которых уровень *ATG12* повышался наиболее существенно, тогда как содержание *MDM2* и *ASK1* в наименьшей степени.

3. Таким образом, микроволны частотой 1 ГГц, в целом, оказывают угнетающее влияние на активность каспазы-3 и процесс апоптоза, обладая активирующим потенциалом в отношении процессов аутофагии.

Литература

1. Власкин С.В., Терехов И.В., Петросян В.И. Способ терапевтического воздействия на биологические объекты электромагнитными волнами и устройство для его осуществления: Патент Российской Федерации RU 2445134. 2006. 23 с.
2. Петросян В.И., Чесноков Б.П., Бриль Г.Е. Онко-радиоволны биосферы: аква-фазоволновая модель развития злокачественных новообразований. Ч.1. Радиофизические основы модели // Биомедицинская радиоэлектроника. 2014. № 1. С. 3-13.
3. Терехов И.В., Бондарь С.С., Хадарцев А.А. Лабораторное определение внутриклеточных факторов противовирусной защиты при внебольничной пневмонии в оценке эффектов низкоинтенсивного СВЧ-излучения // Клиническая лабораторная диагностика. 2016. № 61 (6). С. 380–384.
4. Терехов И.В., Никифоров В.С., Бондарь С.С., Бондарь Н.В., Воеводин А.А. Изменение содержания компонентов IL/TOLL-сигнального пути и NF-κB в мононуклеарных клеток цельной крови под влиянием низкоинтенсивного электромагнитного излучения частотой 1 ГГц // Гены и клетки. 2017. №12 (2). С. 90–96.
5. Терехов И.В., Солодухин К.А., Никифоров В.С. Влияние низкоинтенсивного СВЧ-облучения на внутриклеточные процессы в мононуклеарах при пневмонии // Медицинская иммунология. 2012. Т.14, №6. С. 541–544.
6. Терехов И.В., Хадарцев А.А., Бондарь С.С. Состояние рецепторзависимых сигнальных путей в агранулоцитах периферической крови реконвалесцентов внебольничной пневмонии под влиянием микроволнового излучения // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. 2016. № 93(3). С. 23–28. doi. 10.17116/kurort2016323-28.
7. Хадарцев А.А., Терехов И.В., Никифоров В.С., Бондарь С.С. Продукция цитокинов клетками цельной крови реконвалесцентов внебольничной пневмонии под влиянием низкоинтенсивного СВЧ-

облучения // Вестник новых медицинских технологий (электронный журнал). 2014. URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4815.pdf> (дата обращения 30.06.2014).

8. Хадарцев А.А., Иванов Д.В., Клеточные технологии в восстановительной медицине: Монография / Под ред. А.Н. Лищука. Тула: Тульский полиграфист, 2011. 180 с.

9. Хадарцев А.А., Терехов И.В., Никифоров В.С., Бондарь С.С. Функциональное состояние клеток цельной крови при внебольничной пневмонии и его коррекция СВЧ-излучением // Фундаментальные исследования. 2014. № 10 (4). С. 737–741.

10. Хадарцев А.А., Зилов В.Г., Терехов И.В., Бондарь С.С. Взаимосвязь содержания в мононуклеарных лейкоцитах цельной крови в постклиническую фазу внебольничной пневмонии циклинов, циклин-зависимых киназ и их ингибиторов под влиянием микроволн частотой 1 ГГц // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163, № 5. С. 578–581.

11. Avdi N.J., Malcolm K.C., Nick J.A., Worthen G.S. A role for protein phosphatase-2A in p38 mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway in human neutrophils // J Biol Chem. 2002. № 277(43). P. 40687–40696.

12. Daks A.A., Melino D., Barlev N.A. The role of different E3 ubiquitin ligases in regulation of the P53 tumor suppressor protein // Tsitologija. 2013. № 55(10). P. 673–687.

13. Fujino G., Noguchi T., Matsuzawa A. Thioredoxin and TRAF Family Proteins Regulate Reactive Oxygen Species-Dependent Activation of ASK1 through Reciprocal Modulation of the N-Terminal Homophilic Interaction of ASK1 // Molecular and Cellular Biology. 2007. №27(23). P. 8152–8163. doi:10.1128/MCB.00227-07.

14. Giannini A.L., Gao Y., Bijlmakers M.J. T-cell regulator RNF125/TRAC-1 belongs to a novel family of ubiquitin ligases with zinc fingers and a ubiquitin-binding domain // mBiochem J. 2008. № 410(1). P.101–111.

15. Ishiguro K., Avruch J., Landry A., Qin S., Ando T., Goto H. NORE1B Regulates TCR signaling via Ras and Carma1 // Cellular Signalling. 2006. № 18 (10). P. 1647–1654. doi.10.1016/j.cellsig.2006.01.015.

16. Kumari G., Singhal P.K., Suryaraja R., Mahalingam S. Functional Interaction of the Ras Effector RASSF5 with the Tyrosine Kinase Lck: Critical Role in Nucleocytoplasmic Transport and Cell Cycle Regulation // Journal of Molecular Biology. 2010. № 397 (1). P. 89–109.

17. Macheiner D., Heller G., Kappel S., Bichler C., Stättner S., Ziegler B., Kandioler D., Wrba F., Schulte-Hermann R., Zöchbauer-Müller S., Grasl-Kraupp B. NORE1B, a candidate tumor suppressor, is epigenetically silenced in human hepatocellular carcinoma // Journal of Hepatology. 2006. № 45 (1). P. 81–99. doi.10.1016/j.jhep.2005.12.017.

18. Martinez-Lopez N., Athonvarangkul D., Mishall P., Sahu S., Singh R. Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation // Nature Communications. 2013. №4. P. 2799. DOI:10.1038/ncomms3799.

19. Nick J.A., Young S.K., Brown K.K., Avdi N.J., Arndt P.G., Suratt B.T., Janes M.S., Henson P.M., Worthen G.S. (2000) Role of p38 mitogen-activated protein kinase in a murine model of pulmonary inflammation // J Immunol. №164(4). P. 2151–2159.

20. Nishitoh H., Saitoh M., Mochida Y., Takeda K., Nakano H., Rothe M., Miyazono K., Ichijo H. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2 // Mol Cell. 1998. № 2(3). P. 389–395.

21. Puca R., Nardinocchi L., Givol D., D'Orazi G. Regulation of p53 activity by HIPK2: molecular mechanisms and therapeutical implications in human cancer cells // Oncogene. 2010. № 29(31). P. 4378–4387.

22. Quercetin ameliorates ischemia/reperfusion-induced cognitive deficits by inhibiting ASK1/JNK3/caspase-3 by enhancing the Akt signaling pathway // Biochem Biophys Res Commun. 2016. №478(1). P. 199–205. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.068.

23. Ratovitski E.A. Tumor Protein (TP)-p53 Members as Regulators of Autophagy in Tumor Cells upon Marine Drug Exposure // Mar Drugs. 2016. №14(8). P. 154.

24. Rinaldo C., Prodosmo A., Mancini F., Iacovelli S., Sacchi A., Moretti F., Soddu S. MDM2-regulated degradation of HIPK2 prevents p53Ser46 phosphorylation and DNA damage-induced apoptosis // Mol Cell. 2007. № 25(5). P. 739–750.

25. Romanov J., Walczak M., Ibiricu I. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation // The EMBO journal. 2012. №31(22). P. 4304–4317. DOI:10.1038/emboj.2012.278.

26. Shoji-Kawata S., Zhong Q., Kameoka M., Iwabu Y., Sapsutthipas S., Luftig R.B., Ikuta K. The RING finger ubiquitin ligase RNF125/TRAC-1 down-modulates HIV-1 replication in primary human peripheral blood mononuclear cells // Virology. 2007. № 368(1). P. 191–204.

27. Singh S., Vrishni S., Singh B.K., Rahman I., Kakkar P. Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases // Free Radic Res. 2010. №44(11). P. 1267–1288. doi: 10.3109/10715762.2010.507670.

28. Sunkari V.G., Aranovitch B., Portwood N., Nikoshkov A. Effect of low-intensity electromagnetic field on fibroblast migration and proliferation // Electromagnetic Biology and Medicine. 2011. № 30 (2). P. 80–85.

29. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation //

Nat. Cell Biol. 2001. № 3 (8). P. 708–714. doi:10.1038/35087019.

30. Withers D.R. Innate lymphoid cell regulation of adaptive immunity // *Immunology*. 2016. №149(2). P. 123–130. doi:10.1111/imm.12639.

31. Zeng T., Peng L., Chao H., Xi H., Fu B., Wang Y., Zhu Z., Wang G. IRE1 α -TRAF2-ASK1 complex-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction contribute to CXCL15-induced apoptosis in human bladder carcinoma T24 cells // *Biochem Biophys Res Commun*. 2015. № 460(3). P. 530–566.

32. Zhao H., Li C.C., Pardo J., Chu P.C., Liao C.X., Huang J., Dong J.G., Zhou X., Huang Q., Huang B., A novel E3 ubiquitin ligase TRAC-1 positively regulates T cell activation // *J Immunol*. 2005. № 174(9). P. 5288–5897.

References

1. Vlaskin SV, Terekhov IV, Petrosyan VI. Sposob terapevticheskogo vozdejstviya na biologicheskie ob"ekty ehlektromagnitnymi volnami i ustrojstvo dlya ego osushchestvleniya [method of therapeutic influence on biological objects by electromagnetic waves and device for its implementation]: Patent Russian Federation RU 2445134. 2006. Russian.

2. Petrosyan VI, Chesnokov BP, Brill' GE. Onko-radiovolny biosfery: akva-fazovolnovaya model' razvitiya zlokachestvennykh novoobrazovaniy [Onko-radio waves of biosphere: Aqua-phase-wave model of malignant neoplasms development. Part 1. Radiophysical basis of the model]. CH.1. Radiofizicheskie osnovy modeli. Biomeditsinskaya radioelektronika. 2014;1:3-13. Russian.

3. Terekhov IV, Bondar' SS, KHadarcev AA. Laboratornoe opredelenie vnutrikletochnykh faktorov protivovirusnoj zashchity pri vnebol'nichnoj pnevmonii v ocenke ehffektov nizkointensivnogo SVCH-izlucheniya [Laboratory determination of intracellular antiviral defense factors in community-acquired pneumonia in the evaluation of the effects of low intensity microwave radiation]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016;61 (6):380-4. Russian.

4. Terekhov IV, Nikiforov VS, Bondar' SS, Bondar' NV, Voevodin AA. Izmenenie sodержaniya komponentov IL/TOLL-signal'nogo puti i NF-kB v mononuklearnykh kletok cel'noj krovi pod vliyaniem nizkointensivnogo ehlektromagnitnogo izlucheniya chastotoj 1 GGc [Changes in the content of the components IL/TOLL-signaling pathway and NF-kB in mononuclear cells of whole blood under the influence of low-intensity electromagnetic radiation with a frequency of 1 GHz]. *Geny i kletki*. 2017;12 (2):90-6. Russian.

5. Terekhov IV, Solodukhin KA, Nikiforov VS. Vliyanie nizkointensivnogo SVCH-oblucheniya na vnutrikletochnye processy v mononuklearakh pri pnevmonii [the Effect of low intensity microwave radiation on intracellular processes in mononuclear cells in pneumonia]. *Meditsinskaya immunologiya*. 2012;14(6):541-4. Russian.

6. Terekhov IV, KHadarcev AA, Bondar' SS. Sostoyanie receptorzavisimykh signal'nykh putej v agranulocitakh perifericheskoy krovi rekonvalescentov vnebol'nichnoj pnevmonii pod vliyaniem mikrovolnovogo izlucheniya [State of recuperability signaling pathways in agranulocytes peripheral blood of patients community-acquired pneumonia under the influence of microwave radiation]. *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoy kul'tury*. 2016;93(3):23-8. doi. 10.17116/kurort2016323-28. Russian.

7. KHadarcev AA, Terekhov IV, Nikiforov VS, Bondar' SS. Produkcija citokinov kletkami cel'noj krovi rekonvalescentov vnebol'nichnoj pnevmonii pod vliyaniem nizkointensivnogo SVCH-oblucheniya [Production of cytokines by whole blood cells of patients with community-acquired pneumonia under the influence of low-intensity microwave irradiation]. *Vestnik novykh medicinskih tekhnologij (ehlektronnyj zhurnal)*. 2014 [cited 2014 Jun 30]. Russian. Available from: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4815.pdf>.

8. KHadarcev AA, Ivanov DV Kletochnye tekhnologii v vosstanovitel'noj medicine: Monografiya [Cellular technologies in regenerative medicine: Monograph]. Pod red. Lishchuka AN. Tula: Tul'skij poligrafist; 2011. Russian.

9. KHadarcev AA, Terekhov IV, Nikiforov VS, Bondar' SS. Funkcional'noe sostoyanie kletok cel'noj krovi pri vnebol'nichnoj pnevmonii i ego korrekciya SVCH-izlucheniem [the Functional state of whole blood cells with community-acquired pneumonia and its correction of microwave radiation]. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014;10 (4):737-41. Russian.

10. KHadarcev AA, Zilov VG, Terekhov IV, Bondar' SS. Vzaimosvyaz' sodержaniya v mononuklearnykh lejokocitakh cel'noj krovi v postklinicheskuyu fazu vnebol'nichnoj pnevmonii ciklinov, ciklinzavisimykh kinaz i ikh ingibitorov pod vliyaniem mikrovoln chastotoj 1 GGc [the interrelation between the content in mononuclear leukocytes of whole blood post-clinical phase of community-acquired pneumonia of cyclins, cyclin dependent kinases and their inhibitors under the influence of microwaves 1 GHz]. *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny*. 2017;163(5):578-81. Russian.

11. Avdi NJ, Malcolm KC, Nick JA, Worthen GS. A role for protein phosphatase-2A in p38 mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem*. 2002; 277(43), 40687-96.

12. Daks AA, Melino D, Barlev NA. The role of different E3 ubiquitin ligases in regulation of the P53 tumor suppressor protein. *Tsitologiya*. 2013; 55(10):673-87.

13. Fujino G, Noguchi T, Matsuzawa A, et al. Thioredoxin and TRAF Family Proteins Regulate Reactive Oxygen Species-Dependent Activation of ASK1 through Reciprocal Modulation of the N-Terminal Homophilic

- Interaction of ASK1. *Molecular and Cellular Biology*. 2007;27(23):8152-8163. doi:10.1128/MCB.00227-07.
14. Giannini AL, Gao Y, Bijlmakers MJ. T-cell regulator RNF125/TRAC-1 belongs to a novel family of ubiquitin ligases with zinc fingers and a ubiquitin-binding domain. *Biochem J*. 2008; 410(1):101-11.
15. Ishiguro K, Avruch J, Landry A, Qin S, Ando T, Goto H. NORE1B Regulates TCR signaling via Ras and Carma1. *Cellular Signalling*. 2006; 18 (10): 1647-54. doi:10.1016/j.cellsig.2006.01.015.
16. Kumari G, Singhal PK, Suryaraja R, Mahalingam S. Functional Interaction of the Ras Effector RASSF5 with the Tyrosine Kinase Lck: Critical Role in Nucleocytoplasmic Transport and Cell Cycle Regulation. *Journal of Molecular Biology*. 2010; 397 (1): 89–109.
17. Macheiner D, Heller G, Kappel S, Bichler C, Stättner S, Ziegler B, Kandioler D, Wrba F, Schulte-Hermann R, Zöchbauer-Müller S, Grasl-Kraupp B. NORE1B, a candidate tumor suppressor, is epigenetically silenced in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2006; 45 (1): 81-9. doi:10.1016/j.jhep.2005.12.017.
18. Martinez-Lopez N., Athonvarangkul D., Mishall P., Sahu S., Singh R. Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. *Nature Communications*. 2013;4, 2799. DOI:10.1038/ncomms3799.
19. Nick JA, Young SK, Brown KK, Avdi NJ, Arndt PG, Suratt BT, Janes MS, Henson PM, Worthen GS. (2000) Role of p38 mitogen-activated protein kinase in a murine model of pulmonary inflammation. *J Immunol*. 164(4), 2151-9.
20. Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, Miyazono K, Ichijo H. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell*. 1998; 2(3):389-95.
21. Puca R, Nardinocchi L, Givol D, D'Orazi G. Regulation of p53 activity by HIPK2: molecular mechanisms and therapeutical implications in human cancer cells. *Oncogene*. 2010; 29(31):4378-87.
22. Quercetin ameliorates ischemia/reperfusion-induced cognitive deficits by inhibiting ASK1/JNK3/caspase-3 by enhancing the Akt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;478(1):199-205. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.068.
23. Ratovitski EA. Tumor Protein (TP)-p53 Members as Regulators of Autophagy in Tumor Cells upon Marine Drug Exposure. *Mar Drugs*. 2016;14(8), 154.
24. Rinaldo C, Prodosmo A, Mancini F, Iacovelli S, Sacchi A, Moretti F, Soddu S. MDM2-regulated degradation of HIPK2 prevents p53Ser46 phosphorylation and DNA damage-induced apoptosis. *Mol Cell*. 2007; 25(5):739-50.
25. Romanov J, Walczak M, Ibricic I. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *The EMBO journal*. 2012;31(22), 4304-17. DOI:10.1038/emboj.2012.278.
26. Shoji-Kawata S, Zhong Q, Kameoka M, Iwabu Y, Sapsutthipas S, Luftig RB, Ikuta K. The RING finger ubiquitin ligase RNF125/TRAC-1 down-modulates HIV-1 replication in primary human peripheral blood mononuclear cells. *Virology*. 2007; 368(1):191-204.
27. Singh S, Vrishni S, Singh BK, Rahman I, Kakkar P. Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radic Res*. 2010;44(11):1267-88. doi: 10.3109/10715762.2010.507670.
28. Sunkari VG, Aranovitch B, Portwood N, Nikoshkov A. Effect of low-intensity electromagnetic field on fibroblast migration and proliferation. *Electromagnetic Biology and Medicine*. 2011; 30 (2): 80-5.
29. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat. Cell Biol*. 2001; 3 (8): 708-14. doi:10.1038/35087019.
30. Withers DR. Innate lymphoid cell regulation of adaptive immunity. *Immunology*. 2016;149(2):123-130. doi:10.1111/imm.12639.
31. Zeng T, Peng L, Chao H, Xi H, Fu B, Wang Y, Zhu Z, Wang G. IRE1 α -TRAF2-ASK1 complex-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction contribute to CXC195-induced apoptosis in human bladder carcinoma T24 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 460(3):530-6.
32. Zhao H, Li CC, Pardo J, Chu PC, Liao CX, Huang J, Dong JG, Zhou X, Huang Q, Huang B, et al. A novel E3 ubiquitin ligase TRAC-1 positively regulates T cell activation. *J Immunol*. 2005; 174(9):5288-97.

Библиографическая ссылка:

Бондарь С.С., Терехов И.В. Взаимосвязь активности каспазы-3, регуляторов апоптоза и аутофагии у практически здоровых молодых лиц под влиянием низкоинтенсивного излучения частотой 1 ГГц // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2018. №4. Публикация 3-5. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-4/3-5.pdf> (дата обращения: 05.07.2018). DOI: 10.24411/2075-4094-2018-16105.*

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-4/e2018-4.pdf>