

УДК 57.085.23

Митохондриальный путь апоптоза в клетках эпидермоидной карциномы человека А431 при действии α -токоферилсукцината

М. А. Савицкая*, М. С. Вильданова, О. П. Кисурин-Евгеньева, Е. А. Смирнова, Г. Е. Онищенко

Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: nakomis@mail.ru

Поступила в редакцию 24.05.2012 г.

РЕФЕРАТ В связи с распространенностью злокачественных заболеваний большое внимание уделяется поиску соединений, обладающих противоопухолевой активностью и селективностью в отношении опухолевых клеток. К этим соединениям относятся и такие производные витамина Е, как сукцинат витамина Е (СВЕ). В связи с тем, что опухоли кожи трудно поддаются лечению, мы изучали действие СВЕ на культивируемые клетки эпидермоидной карциномы человека при помощи прижизненного окрашивания флуоресцентными красителями, иммуноцитохимического окрашивания и трансмиссионной электронной микроскопии. Показано, что СВЕ вызывает апоптотическую гибель клеток А431, уровень которой зависит от концентрации и продолжительности воздействия применяемого агента. Индукция апоптоза сопровождается гиперпродукцией активных форм кислорода, изменением формы, размеров и ультраструктуры митохондрий, выходом цитохрома с из митохондрий в цитозоль, что позволяет сделать заключение о митохондриальном механизме апоптоза. Таким образом, показано, что митохондрии служат важной мишенью действия СВЕ при запуске каспазозависимой апоптотической гибели клеток эпидермоидной карциномы человека А431 в культуре.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА α -токоферилсукцинат, апоптоз, митохондрии, активные формы кислорода, цитохром с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СВЕ – сукцинат витамина Е; АФК – активные формы кислорода; АИ – апоптотический индекс; СДГ – сукцинатдегидрогеназа.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время внимание многих исследователей направлено на поиск противоопухолевых средств, селективно действующих на злокачественные клетки, но нетоксичных для нормальных клеток и тканей. В число таких соединений входят производные витамина Е.

Сегодня термин «витамин Е» применяют к целой группе как природных, так и синтетических соединений, называемых токоферолами и токотриенолами, а также к ацетиловым и сукциниловым производным токоферола. Проявления биологической активности витамина Е разнообразны и недостаточно изучены. Некоторые формы витамина Е можно рассматривать в качестве потенциальных противоопухолевых средств, поскольку они могут нейтрализовывать свободные радикалы, подавлять рост трансформированных клеток и индуцировать их дифференцировку, влиять на прохождение клеточного цикла, вызывать

апоптоз, а также усиливать работу иммунной системы [1–3].

Показано, что сам α -токоферол практически не обладает противоопухолевой активностью, в то время как ряд его производных, в том числе и сукцинат витамина Е (α -токоферилсукцинат, СВЕ), в той или иной степени проявляют такую активность. Негидролизированный СВЕ не обладает окислительно-восстановительными свойствами, но, в отличие от свободного α -токоферола, имеет уникальные антипролиферативные и проапоптотические свойства [4]. СВЕ может действовать как на культивируемые опухолевые клетки [5, 6], так и на трансплантированные животным опухоли человека, и опухоли, индуцированные химическими канцерогенами [7–11]. СВЕ может вызывать гибель клеток, остановку клеточного цикла [12, 13], подавлять ангиогенез [14] и защищать организм от действия ионизирующего облучения [15].

Мишени СВЕ в клетках различного происхождения интенсивно изучаются. Показано, что СВЕ запускает апоптотическую гибель ряда опухолевых клеток (рак молочной железы, злокачественная мезотелиома, нейробластома) по митохондриальному пути [16–21]. Тем не менее механизмы СВЕ-индуцированного апоптоза изучены еще недостаточно. Действие СВЕ изучали на культивируемых опухолевых клетках разного происхождения. Опухоли кожи обладают высокой злокачественностью и относятся к числу плохо поддающихся лечению, однако работы, посвященные действию производных витамина Е на трансформированные кератиноциты, в настоящее время практически отсутствуют. Прогноз при злокачественных заболеваниях кожи часто оказывается неблагоприятным.

В связи с этим в представленной работе изучено действие α -токоферилсукцината на культивируемые клетки эпидермоидной карциномы человека А431.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культура клеток и постановка эксперимента

Клетки культуры А431 (эпидермоидная карцинома человека) (Институт цитологии РАН, Россия) росли в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота («РАА Laboratories», Австрия) и 80 мг/мл гентамицина («ПанЭко») при 37°C и 5% CO₂.

В качестве растворителя для СВЕ («Sigma») использовали 96% этанол. Первым контролем служили клетки, среда культивирования которых не содержала добавок. В качестве второго контроля в среду культивирования добавляли этанол. Агент и спирт, используемый в качестве второго контроля, вносили на 2 сут после посадки клеток и инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч.

Оценка уровня гибели клеток

Долю апоптотических клеток в популяции подсчитывали на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, по стандартной методике. Критериями для распознавания клеток, вступивших в апоптоз, служили такие морфологические признаки, как конденсация хроматина, уплотнение и блеббинг цитоплазмы. Оценивали действие СВЕ в концентрации 20, 40, 60 и 100 мкМ. Препараты анализировали на микроскопе Leica DM 1000 с использованием объектива N PLAN 100x/1.25 Oil. Результаты обрабатывали в программе Microsoft Office Excel 2007.

Цитохимия и иммуноцитохимия

Для иммуноцитохимических исследований клетки фиксировали 4% формальдегидом («MP

Biochemicals», Франция), приготовленным на 0.1 М буфере PBS («Sigma») pH 7.2. Препараты окрашивали моноклональными антителами мыши к активной форме каспазы-3 («Sigma»), антителами овцы к цитохрому с («Sigma»). В качестве вторых антител использовали антитела к Ig мыши, конъюгированные с Alexa Fluor-488 («Sigma»), и антитела к Ig овцы, конъюгированные с Alexa Fluor-488 («Invitrogen», США) соответственно. Ядра клеток докрасивали DAPI (100 нМ, «Sigma»). Препараты заключали в PBS–глицерин (1 : 1) и анализировали на люминесцентном микроскопе Axiovert 200M («Carl Zeiss Inc.», Германия) с использованием объектива Plan-NEOFLUAR 100x/1.30. Снимки обрабатывали с помощью программ Adobe Photoshop и ImageJ.

Митохондрии выявляли при помощи потенциал-зависимого красителя Mitotracker Orange CMTRos (100 нМ, «Invitrogen Molecular Probes»). Клетки фиксировали 4% формальдегидом («MP Biochemicals», Франция), приготовленным на 0.1 М буфере PBS pH 7.2, и заключали в смесь PBS–глицерин (1 : 1).

Прижизненные наблюдения

Для выявления АФК в среду добавляли 2',4'-дихлорфлуоресцеиндиацетат (DCFH-DA, «BioChemika», США) в концентрации 10 мкМ и выдерживали в течение 20 мин. В присутствии АФК (пероксид водорода, пероксид-анион, пероксид-радикал) в клетке образуется флуоресцентный продукт окисления – дихлорфлуоресцеин. DCFH-DA вносили через 48 ч после внесения СВЕ в среду культивирования. Фото съемку проводили на люминесцентном микроскопе Axiovert 200M («Carl Zeiss Inc.») с использованием объектива Plan-NEOFLUAR 20x/0.50. Подсчитывали долю АФК-положительных клеток на снимках. Статистическую обработку проводили в программе Microsoft Excel. Фотографии обрабатывали при помощи программы Adobe Photoshop CS3.

Трансмиссионная электронная микроскопия

Для электронно-микроскопического исследования клетки фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом («Sigma») с 2% формалином в 0.1 М PBS pH 7.2 («Sigma»). Постфиксацию проводили 1% раствором OsO₄ («Sigma») в PBS в течение 1 ч в темноте. Далее использовали стандартные процедуры приготовления препаратов для трансмиссионной электронной микроскопии. Ультратонкие срезы (60–80 нм) изготавливали на ультрамикротоме Ultratom-5 («LKB», Швеция). Срезы окрашивали 1.5% водным раствором уранилацетата («Serva», США) и цитратом свинца («Serva») по Рейнольдсу. Препараты анализировали при помощи трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1011 («JEOL») с цифровой фотокамерой

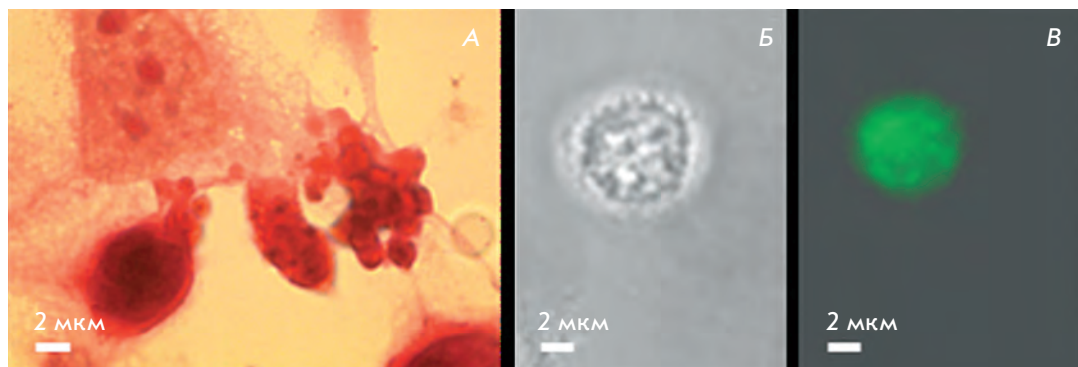


Рис. 1. Апоптоз в культуре клеток А431. А – Окраска гематоксилином и эозином; Б – фазовый контраст; В – иммуноцитохимическое выявление каспазы-3 в клетке, показанной на «Б».

GATAN ES500W, работающей под управлением программы Digital Micrograph фирмы «GATAN» и трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100B («JEOL»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

СВЕ вызывает апоптотическую гибель клеток А431 и его эффект зависит от концентрации и продолжительности воздействия

На препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, обнаружен только один тип гибели клеток – апоптоз. Апоптотические клетки можно было выявить по ряду критериев, таких, как ошаривание, уплотнение цитоплазмы, конденсация хроматина, блеббинг и распад на апоптотические тельца. Некротические клетки не выявлены (рис. 1А). Присутствие активной формы каспазы-3 (рис. 1Б,В) также указывает на апоптотический путь гибели клеток.

Величина АИ в контрольных образцах культуры клеток А431 составляет 0.4–0.9%, а добавление 96% этанола практически не влияет на величину АИ. На 2-е сут инкубации клеток с СВЕ в концентрации 40 мкМ АИ значительно повышается (9.67%) и остается на том же уровне на 3-и сут. При добавлении 60 мкМ СВЕ на 1-е сут АИ практически не меняется, на 2-е резко повышается (более 60%), а на 3-и клетки на стеклах не обнаруживаются. Подобный эффект наблюдается и при действии 100 мкМ СВЕ (63.5%), но величины АИ в этом случае наиболее высокие (рис. 2).

Таким образом, статистический анализ показал, что под действием СВЕ увеличивается уровень гибели клеток линии А431, причем эффект зависит от концентрации и продолжительности воздействия.

При концентрации СВЕ, равной 40 мкМ, и инкубации в течение 48 ч величина АИ заметно повышается, но массовая гибель клеток еще не происходит, поэтому данная доза была выбрана для изучения механизма индукции апоптоза.

СВЕ вызывает изменение структуры митохондрий и выход цитохрома с из митохондрий в цитозоль

Согласно опубликованным данным, во многих линиях клеток СВЕ запускает апоптоз по митохондриальному механизму. С целью изучения роли митохондриального механизма в запуске апоптоза анализировали общую структуру хондриома, ультраструктуру митохондрий, локализацию цитохрома с и уровень индукции АФК.

Для анализа состояния хондриома в контроле и при воздействии СВЕ клетки окрашивали потенциал-зависимым красителем Mitotracker Orange СМТМRos, способным накапливаться только в работающих митохондриях. На рис. 3А,Б представлены клетки А431, у которых хондриом образован многочисленными митохондриями, среди которых встречаются небольшие овальные, округлые и нитевидные митохондрии, изогнутые, с перетяжками и т.д. Как правило, митохондрии распределены равномерно по всей цитоплазме, очень редко они образуют скопления вокруг ядра, иногда располагаются в периферической цитоплазме. В отдельных случа-

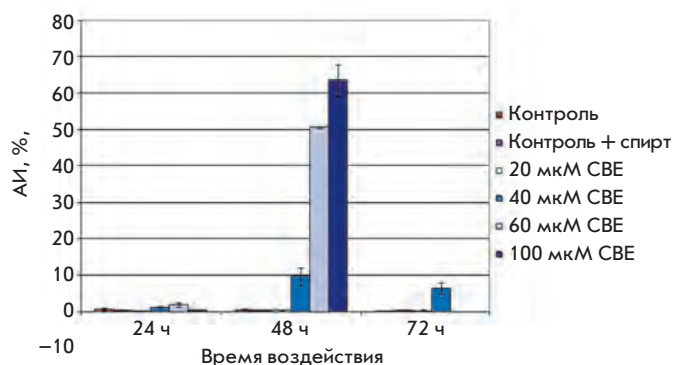


Рис. 2. Зависимость апоптотического индекса клеток в культуре А431 от концентрации СВЕ и времени инкубации.

ях могут встречаться крупные овальные и округлые митохондрии (рис. 3А). При добавлении спирта распределение митохондрий и их форма не изменяются (рис. 3Б).

Под действием СВЕ изменяется форма митохондрий, появляются многочисленные крупные округлые и овальные митохондрии, значительно превосходящие по размеру митохондрии в контрольных клетках. Число таких митохондрий в клетке может различаться, но в целом их, как правило, заметно меньше, чем в контрольных клетках.

Локализацию цитохрома с определяли иммуноцитохимически. Выход цитохрома с из митохондрий в цитозоль является ключевым процессом в апоптозе, протекающем по митохондриальному («внутреннему») пути.

В контроле и в контроле с добавлением спирта антитела к цитохрому с выявляют данный белок в составе митохондрий. Как видно из рис. 4А,Б митохондрии небольшие, многочисленные, часто имеют нитевидную форму. Иногда встречаются небольшие овальные и округлые митохондрии.

В клетках, которые культивировали в присутствии СВЕ (рис. 4В–Е), можно проследить различную степень окрашивания цитоплазмы и разное количество окрашенных митохондрий, что свидетельствует о выходе цитохрома с из некоторых митохондрий в цитозоль. Так, на рис. 4Г видна клет-

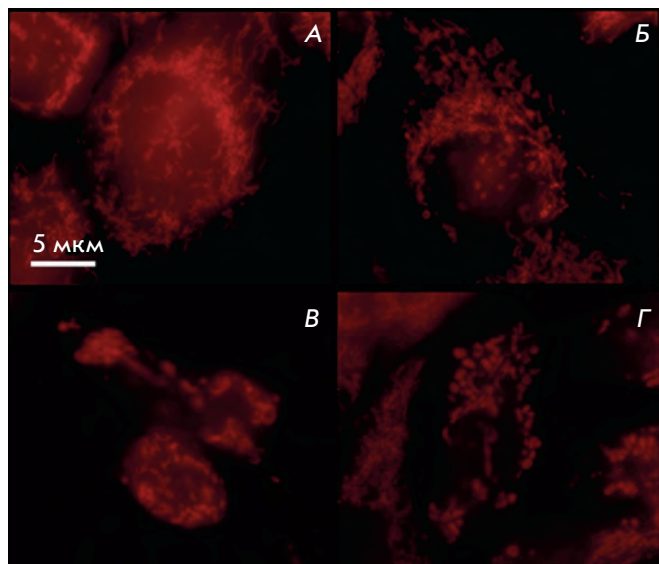
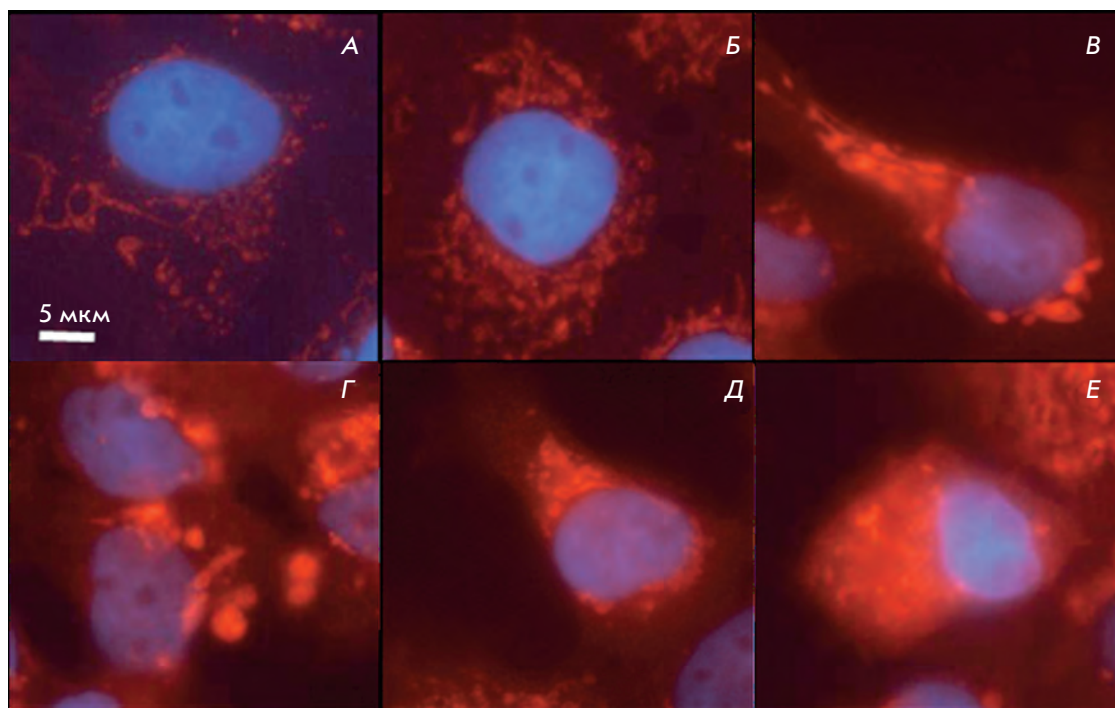


Рис. 3. Митохондрии в клетках А431, окрашенные Mitotracker Orange. А – контроль; Б – контроль с добавлением спирта; В, Г – 40 мкМ СВЕ, 48 ч.

Рис. 4. Иммуноцитохимическое выявление цитохрома с в клетках А431. А, Б – контроль; В–Е – 40 мкМ СВЕ, 48 ч.



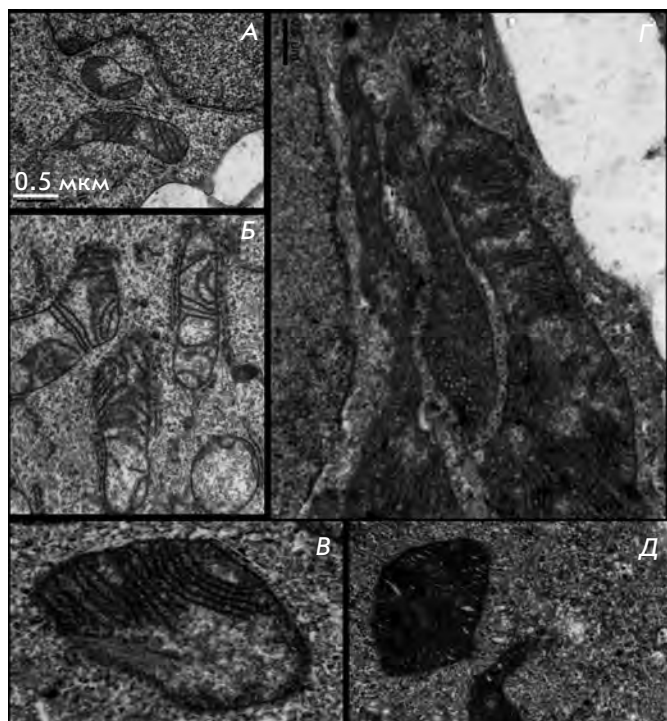


Рис. 5. Ультраструктура митохондрий в клетках A431. А – Контроль; Б – контроль с добавлением спирта; В–Д – 40 мкМ СВЕ, 48 ч.

ка, митохондрии в которой увеличены в размерах и приобрели округлую и овальную форму. При этом цитоплазма остается практически неокрашенной. На рис. 4Д представлена клетка, митохондрии в которой сходны по размеру с митохондриями контрольных клеток. Однако, в отличие от последних, они имеют вид коротких овальных телец. На рис. 4Е виден выход цитохрома с из митохондрий в цитозоль. Следует отметить, что отдельные митохондрии содержат цитохром с.

При ультраструктурном исследовании клеток эпидермоидной карциномы обнаруживаются небольшие митохондрии со светлым матриксом и сравнительно немногочисленными тонкими кристами (рис. 5А,Б). При воздействии СВЕ митохондрии претерпевают значительные изменения (рис. 5В–Д). На срезах могут встречаться гигантские митохондрии с большим количеством крист, митохондрии с инвагинациями, отдельные участки которых заполнены многочисленными кристами (рис. 5Г). В некоторых митохондриях матрикс уплотнен, а кристы расширены (рис. 5Д). Встречаются также митохондрии, ультраструктура которых практически такая же, как у митохондрий контрольных клеток. Интересно отметить, что митохондрии с различной

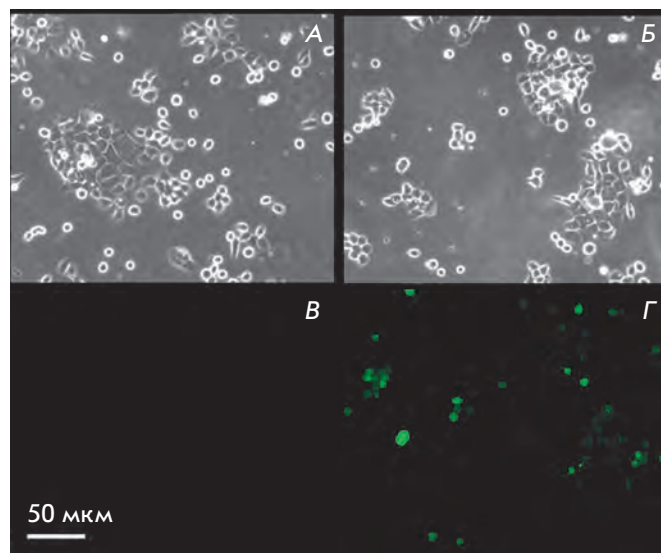


Рис. 6. Прижизненное выявление пероксида водорода в клетках A431. А, В – Контроль; Б, Г – 40 мкМ СВЕ, 48 ч.

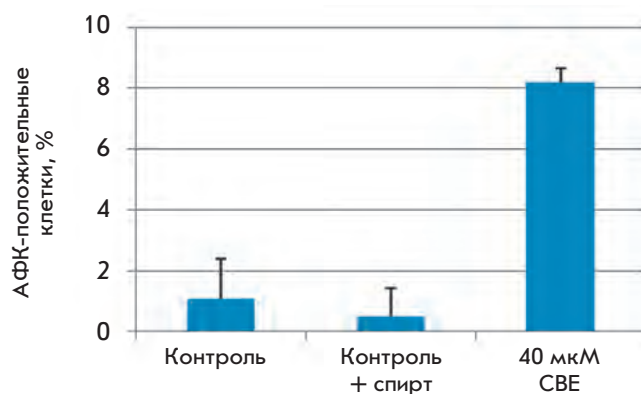


Рис. 7. Прижизненное выявление пероксида водорода в клетках A431. Доля окрашенных клеток в контроле и при воздействии 40 мкМ СВЕ в течение 48 ч.

ультраструктурой могут встречаться в цитоплазме одной и той же клетки. Возможно, гетерогенность популяции митохондрий отражает различные стадии изменений, происходящих с ними при воздействии СВЕ.

СВЕ повышает уровень АФК в клетках линии A431
 Гибель клеток может опосредоваться увеличением продукции АФК. В связи с этим проведено прижизненное окрашивание клеток красителем DCFH-DA,

что позволяет выявлять пероксид водорода. В контроле окрашивание выявляет одиночные флуоресцирующие клетки (рис. 6А,В), а добавление спирта видимых изменений не вызывает.

Воздействие 40 мкМ СВЕ в течение 48 ч приводит к значительному усилению продукции АФК в клетках. Доля окрашенных клеток (рис. 7) как в контроле, так и при добавлении 96% этанола относительно невысока и составляет 0.08 и 0.49% соответственно. При этом под действием СВЕ доля клеток с избыточным содержанием АФК значительно повышается и составляет 8.18%.

Таким образом, в ходе данной работы показано, что СВЕ дозозависимо индуцирует апоптотическую гибель клеток в культуре эпидермоидной карциномы человека А431. Морфологически выявляются такие характерные для апоптоза признаки, как блеббинг, конденсация хроматина, фрагментация ядер и распад клетки на апоптотические тельца. Кроме того, апоптотический путь гибели подтверждается тем, что клетки окрашиваются антителами к активной форме каспазы-3. При этом таких признаков некроза, как набухание клетки, не обнаружено. Имеются данные о том, что СВЕ вызывает апоптотическую гибель злокачественных клеток желудка [22], толстого кишечника [10], молочной железы [23, 16], предстательной железы [17], легкого [24], шейки матки, яичника [25], клеток гепатомы [26], остеосаркомы [12, 13], мезотелиомы [27, 28], Т-клеточной лимфомы Jurkat [8, 18, 29] и других злокачественных линий кровяных клеток [8, 19], меланомы и глиомы мыши и нейробластомы крысы и человека [30, 31]. Показано, что апоптоз вызывается микромолярными концентрациями СВЕ, причем эффект зависит от концентрации и продолжительности инкубации [8, 18, 32–35]. Нами показано, что индукция апоптоза в клетках эпидермоидной карциномы человека также является дозозависимой.

В отличие от α -токоферола, известного своими антиоксидантными свойствами, СВЕ является редокс-неактивным соединением и не обладает антиоксидантными свойствами [35]. Напротив, как показано нами и другими авторами [21], в опухолевых клетках СВЕ способен действовать как прооксидант, усиливая генерацию кислородных радикалов.

Большое количество исследований указывает на то, что главной мишенью действия СВЕ на опухолевые клетки служат митохондрии [18, 19, 35–38]. Нами выявлено значительное изменение ультраструктуры митохондрий, а также выход цитохрома с из митохондрий в цитозоль клеток линии А431. Можно предположить, что усиление продукции АФК и выход цитохрома с представляют собой связанные

процессы. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что СВЕ способен значительно повышать генерацию АФК в различных линиях клеток, таких, как клетки опухолей молочной железы человека и мыши, Т-клеточной лимфомы Jurkat, фибробласты легкого китайского хомячка, клетки злокачественной мезотелиомы, рака головы и шеи человека [27, 36–40]. В большинстве работ указывается, что ведущая роль в апоптозе, следующем за гиперпродукцией АФК, принадлежит супероксидному анион-радикалу, но Gu et al. [40] показали, что в клетках эпидермоидной карциномы преобладает пероксид водорода, а количество супероксида незначительно. В данной работе выявлено также значительное увеличение доли клеток, в которых наблюдается гипергенерация АФК. Краситель DCFH-DA способен взаимодействовать с пероксидом водорода, следовательно, в нашей работе выявлено образование пероксида водорода. Поскольку в клетках пероксид образуется из супероксидного анион-радикала, по всей вероятности, первичной формой кислородных радикалов служит именно $O_2^{\cdot-}$.

Основное место образования АФК внутри клетки – митохондрии, где свободные радикалы генерируются благодаря работе цепи переноса электронов. Показано, что СВЕ способен подавлять активность комплексов I [41] и II дыхательной цепи митохондрий. Ингибирование комплекса II под действием СВЕ наблюдали в клетках рака молочной железы, клетках Jurkat, тимоцитах крысы [36, 42, 43]. Есть данные о том, что активность комплекса II снижается благодаря тому, что СВЕ служит псевдосубстратом для СДГ, связываясь с Q_p - и Q_D -сайтами ферментного комплекса. Таким образом, ингибирование носит конкурентный характер. При замещении убихинона на СВЕ в сайте связывания убихинона электроны не транспортируются по гидрофильной части СДГ на FAD, [Fe-S]-центры, гем и убихинон. Вместо этого они рекомбинируют с молекулярным кислородом, образуя супероксидный анион-радикал, накопление которого, в конечном счете, может приводить к апоптозу опухолевых клеток [38].

Известно, что усиление генерации АФК может запускать развитие апоптоза по митохондриальному пути. АФК способны опосредовать формирование дисульфидных мостиков между мономерами Вах в цитозоле, что приводит к образованию каналов во внешней митохондриальной мембране [42], а также разрушать связь цитохрома с с кардиолипином, мембранным фосфолипидом митохондрий, вызывая его гидропероксидацию [43, 44]. АФК, образующиеся при культивировании клеток в присутствии СВЕ, могут вызывать диссоциацию цитохрома с от кардио-

липина и выход белка в цитозоль, где цитохром с запускает активацию каспаз.

Отметим, что цитохром с выходит не одновременно из всех митохондрий. Даже в тех клетках, где цитоплазма достаточно сильно окрашена антителами к цитохрому с, сохраняется несколько митохондрий, содержащих цитохром с. При этом такие митохондрии, как правило, сильно увеличены в размерах и имеют овальную или округлую форму. Такие же крупные митохондрии выявляются при окрашивании клеток потенциал-зависимым красителем Mitotracker Orange. Поскольку для выхода цитохрома с необходимо нарушение проницаемости митохондриальной мембраны, выход должен сопровождаться потерей мембранного потенциала. Таким образом, нами показано, что при воздействии СВЕ в клетках могут сохраняться митохондрии, содержащие цитохром с и обладающие мембранным потенциалом, т.е. митохондрии, участвующие в синтезе АТФ, продукция которого необходима даже на поздних этапах апоптоза, являющегося энергозависимым процессом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что митохондрии являются важной мишенью действия СВЕ на культуру клеток эпидермоидной карциномы А431. Обнаружено, что под действием СВЕ изменяется форма митохондрий и их ультраструктура, усиливается продукция АФК и выход цитохрома с из митохондрий в цитозоль, что приводит к запуску каспазозависимого апоптоза. Полученные результаты позволяют предложить следующий механизм индукции клеточной гибели под действием СВЕ. α -Токоферилсукцинат ингибирует действие комплекса II дыхательной цепи, в результате чего транспорт электронов нарушается, и усиливается образование АФК. АФК, в свою очередь, накапливаются в клетке и повреждают митохондрии, что приводит к выходу цитохрома с в цитозоль и запуску программы апоптотической каспазозависимой гибели клетки. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных
исследований (проект № 11-04-01518-а).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Prasad K.N., Edwards-Prasad J. // J. Am. Coll. Nutr. 1992. V. 11. P. 487–500.
- Kelloff G.J., Crowell J.A., Boone C.W., Steele V.E., Lubet R.A., Greenwald P., Alberts D.S., Covey J.M., Doody L.A., Knapp G.G., et al. // J. Cell Biochem. Suppl. 1994. V. 20. P. 282–299.
- Theriault R.L., Lipton A., Hortobagyi G.N., Leff R., Gluck S., Stewart J.F., Costello S., Kennedy I., Simeone J., Seaman J.J., et al. // J. Clin. Oncol. 1999. V. 17. P. 846–854.
- Fariss M.W., Fortuna M.B., Everett C.K., Smith J.D., Trent D.F., Djuric Z. // Cancer Res. 1994. V. 54. P. 3346–3351.
- Kline K., Yu W., Sanders B.G. // Mol. Carcinog. 1998. V. 22. № 4. P. 247–257.
- Kline K., Yu W., Sanders B.G. // J. Nutr. 2001. V. 131. P. 161–163.
- Malafa M.P., Neitzel L.T. // J. Surg. Res. 2000. V. 93. P. 163–170.
- Neuzil J., Weber T., Gellert N., Weber C. // Br. J. Cancer. 2001. V. 84. P. 87–89.
- Malafa M.P., Fokum F.D., Smith L., Louis A. // Ann. Surg. Oncol. 2002. V. 9. P. 1023–1032.
- Weber T., Lu M., Andera L., Zhao Y. // World J. Gastroenterol. 2001. V. 7. P. 83–87.
- Alleva R., Benassi M.S., Pazzaglia L., Tomasetti M., Gellert N., Borghi B., Neuzil J., Picci P. // Cancer Lett. 2006. V. 232. № 2. P. 226–235.
- Alleva R., Benassi M.S., Tomasetti M., Gellert N., Ponticelli F., Borghi B., Picci P., Neuzil J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 331. № 4. P. 1515–1521.
- Yu W., Sanders B.G., Kline K. // Nutr. Cancer. 2002. V. 43. № 2. P. 227–236.
- Dong L.-F., Swettenham E., Eliasson J., Wang X.-F., Gold M., Medunic Y., Stantic M., Low P., Prochazka L., Witting P.K., et al. // Cancer Res. 2007. V. 67. P. 11906–11913.
- Singh V.K., Brown S.D., Kao T.-C. // Int. J. Rad. Biol. 2010. V. 86. № 1. P. 12–21.
- Prochazka L., Dong L.F., Valis K., Freeman R., Ralph S.J., Turanek J., Neuzil J. // Apoptosis. 2010. V. 15. № 7. P. 782–794.
- Shiau C.W., Huang J.W., Wang D.S., Weng J.R., Yang C.C., Lin C.H., Li C., Chen C.S. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 17. P. 11819–11825.
- Neuzil J., Svensson I., Weber T., Weber C., Brunk U.T. // FEBS Lett. 1999. V. 445. № 2–3. P. 295–300.
- Yamamoto S., Tamai H., Ishisaka R., Kanno T., Arita K., Kobuchi H., Utsumi K. // Free Radic. Res. 2000. V. 33. № 4. P. 407–418.
- Yu W., Heim K., Qian M., Simmons-Menchaca M., Sanders B.G., Kline K. // Nutr. Cancer. 1997. V. 27. P. 267–278.
- Gogvadze V., Norberg E., Orrenius S., Zhivotovskiy B. // Int. J. Cancer. 2010. V. 127. № 8. P. 1823–1832.
- Zhao Y., Zhao X., Yang B., Neuzil J., Wu K. // Cancer Lett. 2007. V. 247. № 2. P. 345–352.
- Charpentier A., Groves S., Simmons-Menchaca M., Turley J., Zhao B., Sanders B.G., Kline K. // Nutr. Cancer. 1993. V. 19. P. 225–239.
- Lim S.J., Choi M.K., Kim M.J., Kim J.K. // Exp. Mol. Med. 2009. V. 41. № 10. P. 737–745.
- Anderson K., Simmons-Menchaca M., Lawson K.A., Atkinson J., Sanders B.G., Kline K. // Cancer Res. 2004. V. 64. № 12. P. 4263–4269.
- Min J., Guo J., Zhao F., Cai D. // Wei Sheng Yan Jiu. 2003. V. 32. № 4. P. 343–345.
- Stapelberg M., Gellert N., Swettenham E., Tomasetti M., Witting P.K., Procopio A., Neuzil J. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 27. P. 25369–25376.
- Stapelberg M., Tomasetti M., Alleva R., Gellert N., Procopio A., Neuzil J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 318. № 3. P. 636–641.
- Neuzil J., Zhao M., Ostermann G., Sticha M., Gellert N., Weber C., Eaton J.W., Brunk U.T. // Biochem. J. 2002. V. 362. P. 709–715.

30. Rama B.N., Prasad K.N. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1983. V. 174. № 2. P. 302–307.
31. Swettenham E., Witting P.K., Salvatore B.A., Neuzil J. // *J. Neurochem.* 2005. V. 94. № 5. P. 1448–1456.
32. Wu K., Zhao Y., Liu B.H., Li Y., Liu F., Guo J., Yu W.P. // *World J. Gastroenterol.* 2002. V. 8. № 1. P. 26–30.
33. Zu K., Hawthorn L., Ip C. // *Mol. Cancer Ther.* 2005. V. 4. № 1. P. 43–50.
34. Bellezza J., Tucci A., Galli F., Grottelli S., Mierla A.L., Pololli F., Minelli A. // *J. Nutr. Biochem.* 2012. (Epub. ahead of print.)
35. Neuzil J., Tomasetti M., Zhao Y., Dong L.F., Birringer M., Wang X.F., Low P., Wu K., Salvatore B.A., Ralph S.J. // *Mol. Pharmacol.* 2007. V. 71. № 5. P. 1185–1199.
36. Wang X.F., Witting P.K., Salvatore B.A., Neuzil J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 326. № 2. P. 282–289.
37. Petrova G.V. // *Ukr. Biokhim. Zh.* 2006. V. 78. № 4. P. 104–111.
38. Dong L.F., Low P., Dyason J.C., Wang X.F., Prochazka L., Witting P.K., Freeman R., Swettenham E., Valis K., Liu J., et al. // *Oncogene.* 2008. V. 27. № 31. P. 4324–4335.
39. Kang Y.H., Lee E., Choi M.K., Ku J.L., Kim S.H., Park Y.G., Lim S.J. // *Int. J. Cancer.* 2004. V. 112. № 3. P. 385–392.
40. Gu X., Song X., Dong Y., Cai H., Walters E., Zhang R., Pang X., Xie T., Guo Y., Sridhar R., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 14. № 6. P. 1840–1848.
41. Dos Santos G.A., Abreu E., Lima R.S., Pestana C.R., Lima A.S., Scheucher P.S., Thomé C.H., Gimenes-Teixeira H.L., Santana-Lemos B.A., Lucena-Araujo A.R., et al. // *Leukemia.* 2012. V. 26. № 3. P. 451–460.
42. Neuzil J., Wang X.F., Dong L.F., Low P., Ralph S.J. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. № 22. P. 5125–5129.
43. Dong L.F., Freeman R., Liu J., Zabalova R., Marin-Hernandez A., Stantic M., Rohlena J., Valis K., Rodriguez-Enriquez S., Butcher B., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. № 5. P. 1593–1600.
44. D'Alessio M., De Nicola M., Coppola S., Gualandi G., Pugliese L., Cerella C., Cristofanon S., Civitavecchia P., Ciriolo M.R., Bergamaschi A., et al. // *FASEB J.* 2005. V. 19. № 11. P. 1504–1506.